

302827

9

29



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**ESTUDIO CITOGENETICO
DE ADENOCARCINOMA PULMONAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

LUZ MARIA GARCIA RODRIGUEZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, FUE REALIZADO
EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.
BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. JEANNETTE GUARNER,
LA BIOLOGA MARIA TERESA SALLES MANUEL Y EL
DR. LEON GREEN.**

**CON AGRADECIMIENTO AL M. EN IBB. RAUL BARRERA
RODRIGUEZ, DR. FRUMENCIO MEDINA, DR. JORGE
MORALES Y EL DR. JORGE CHAVARRIA GARCES. DEL
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS,
POR LA AYUDA BRINDADA AL PROPORCIONAR
EL MATERIAL BIOLOGICO Y LA INFORMACION DE PACIENTES
NECESARIA PARA LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.**

**Con agradecimiento especial
A la Dra. Jeannette Guarner por su
valioso apoyo para la realización
del presente trabajo.**

**Con cariño a la bióloga María Teresa
Salles Manuel por su ayuda incondicional.**

Al Dr. León Green por su invaluable asesoría.

**Gracias a Dios por haberme dado la vida
y por iluminar mi camino.**

A mi papá por su ejemplo y por su
gran herencia: el estudio y la educación.

A mi mamá por su cariño y por
su constante esfuerzo en hacer una
mujer de bien.

Con cariño a mis hermanos
Miguel Angel y Juan Carlos
por su constante apoyo.

Angélica donde quiera que estés
gracias por todo lo que me enseñaste.

**A mi abuelita Josefina y a la
memoria de mi abuelita Lucita.**

**A Javier con todo mi cariño
por su amor y su constante apoyo.**

**A mi familia y amigos por todas
sus enseñanzas y ayuda desinteresada.**

**A mis maestros por sus valiosos
conocimientos.**

**A todas aquellas personas que con su apoyo
hicieron posible este trabajo.**

INDICE

Capítulo I		INTRODUCCION	Pag.
1.1	Planteamiento del problema		1
1.2	Objetivos		2
1.2.1	Objetivo general		2
1.2.2	Objetivos particulares		2
1.3	Hipotesis		3
Capítulo II		ANTECEDENTES	
2.1	Cáncer de pulmón		4
2.1.1	Generalidades de cáncer de pulmón		4
2.1.2	Tipos histológicos de cáncer de pulmón		5
2.1.3	Clasificación del cáncer de pulmón por estadios		6
2.1.4	Factores predisponentes en el cáncer de pulmón		7
2.1.5	Adenocarcinoma pulmonar		8
2.1.6	Generalidades del líquido pleural		8
2.2	Citogenética y cancer		13
2.2.1	Principios generales de citogenética		13
2.2.2	Fundamentos de algunas técnicas de interés utilizadas en citogenética		21
2.2.3	Relación entre citogenética y cancer		23
2.3	Cáncer de pulmón y citogenética		25
2.3.1	Principales hallazgos citogenéticos en el cáncer de pulmón		25

2.3.2	Citogenética en adenocarcinoma pulmonar	25
2.3.3	Estudio citogenético en líquido pleural	25

Capítulo III **PARTE EXPERIMENTAL**

3.1	Diagrama de flujo	27
3.2	Material, reactivos y equipo	28
3.2.1	Material biológico	28
3.2.2	Material de laboratorio	28
3.2.3	Reactivos	29
3.2.4	Equipo	31
3.3	Metodología	31
3.3.1	Recolección y procesamiento de la biopsia y líquido pleural	32
3.3.1.1	Examen directo	33
3.3.1.2	Cultivo celular	34
3.3.1.3	Tinciones	35
3.3.1.4	Cariotipos	36

Capítulo IV **RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1	Resultados	37
4.1.1	Datos demográficos	37
4.1.2	Probables factores predisponentes	39
4.1.3	Histopatología	41
4.1.4	Síntomas, signos y duración del cuadro clínico	43

4.1.5	Resultados de laboratorio	45
4.1.6	Estudio citoquímico de líquido pleural	47
4.1.7	Estudio citogenético	49
4.1.8	Correlación de los datos clínicos con los hallazgos citogenéticos	54
4.2	Discusión	58
4.2.1	Datos demográficos	58
4.2.2	Probables factores predisponentes	58
4.2.3	Histopatología	58
4.2.4	Síntomas, signos y duración del cuadro clínico	59
4.2.5	Resultados de laboratorio	59
4.2.6	Citoquímico de líquido pleural	59
4.2.7	Estudio citogenético	60
4.2.8	Correlación de los datos clínicos con los hallazgos citogenéticos	60

Capítulo V

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA	62
APÉNDICE	65

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A principios del siglo XX, el cáncer de pulmón era un tumor poco frecuente; actualmente se ha convertido en el tumor más común en el hombre en los países industrializados y el segundo en frecuencia en la mujer (27). En México ocupa el 5º lugar como causa de mortalidad general (7,11,24). Este aumento se debe principalmente al tabaquismo y a probables factores de contaminación ambiental, por lo que se ha convertido en un problema serio de salud pública a nivel mundial. Los resultados globales de supervivencia a 5 años son del 13 % (24), debido a que el diagnóstico se hace demasiado tarde la mayoría de las veces. En la actualidad no se cuenta con métodos para diagnosticar cáncer de pulmón en estadios tempranos, ya que el paciente en estos estadios no presenta síntomas.

Se han hecho innumerables estudios citogenéticos y biomoleculares, con la finalidad de investigar si existe alguna aberración cromosómica o hay algún oncogene que se pueda relacionar directamente con el comportamiento clínico de estos tumores (5,14,23). La mayoría de los estudios citogenéticos se han realizado en cáncer de pulmón de células pequeñas, encontrando con frecuencia una alteración en el cromosoma 3; en el brazo corto (p) específicamente en la banda (14-23) (14,18,30,32,35). En la actualidad existen muy pocos reportes sobre estudios citogenéticos en Adenocarcinomas pulmonares, ya que sólo en el 50% de los casos se obtiene material que puede analizarse citogenéticamente (29,30).

1.2 OBJETIVOS.

1.2.1 OBJETIVO GENERAL.

Demostrar si existe relación entre el estudio citogenético en material de punciones tumorales y líquido pleural con algunos aspectos como son: características clínicas, respuesta al tratamiento, exposición a factores de riesgo y sobrevida en pacientes con Adenocarcinoma pulmonar.

1.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si existe alguna alteración citogenética que se pueda utilizar como marcador en el diagnóstico de la enfermedad y en el pronóstico del comportamiento del tumor en cuanto a la sobrevida.
- Analizar si hay alguna relación entre la citogenética y el comportamiento clínico de estos tumores.
- Establecer una relación entre la pobre respuesta al tratamiento, la exposición a algún factor predisponente, la duración del cuadro clínico, el grado de diferenciación histológico y la respuesta ante agentes antimitóticos con los hallazgos citogenéticos.

1.3 HIPOTESIS.

Existe una alteración citogenética específica en los pacientes con Adenocarcinoma pulmonar la cual se puede relacionar con los hallazgos clínicos de estos tumores.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 CANCER DE PULMON

2.1.1 GENERALIDADES DE CANCER DE PULMON.

El cáncer de pulmón es un serio problema de salud en el mundo entero ya que anualmente mueren miles de personas a causa de esta enfermedad (en E.U. mueren anualmente 125,000 personas a causa de esta enfermedad, lo que representa un 25% del total de muertes producidas por cáncer y el 5% del total de las defunciones) (27, 34). Esta neoplasia, no tiene predilección por algún sexo en especial ni por una edad específica, pero si se ha reportado que es un padecimiento que se presenta en adultos en un intervalo de edades entre 35 y 70 años (13,16,22,24,27).

Debido a que los síntomas se dan cuando el cáncer pulmonar se encuentra en etapas avanzadas, en muy pocas ocasiones el diagnóstico se hace en etapas clínicas tempranas. En etapas tempranas es posible un buen control de la enfermedad (hasta del 70 %) (27,34). Las personas que tienen alto riesgo de contraer este padecimiento son los fumadores o aquellos que por cuestiones de trabajo están expuestos a diversos agentes ambientales. Para ellos se recomiendan que se tomen una placa de tórax por lo menos cada 6 meses con la finalidad de poderlo detectar en estadios clínicos tempranos (27,34).

En estadios tempranos la enfermedad puede cursar asintomática pero en etapas más avanzadas puede presentar efectos locales como es la tos; en la mayoría de los casos y con menor frecuencia existe hemoptisis, disnea, dolor en el tórax, obstrucción de la vena cava superior y derrame pleural (13,27,34).

Los diversos tratamientos que existen para el cáncer de pulmón son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. La elección de alguno de estos en particular o de su combinación depende del tipo histológico, el grado de diferenciación y del estadio clínico de la enfermedad. Por ejemplo en el

cáncer de células no pequeñas, cuando la enfermedad es resecable el tratamiento de elección es cirugía sola o seguida de radioterapia. En pacientes con tumores irreseccables, se administra tratamiento paliativo con quimioterapia y radioterapia aislados o combinados, con el objeto de detener el crecimiento del tumor y paliar los efectos sistémicos y el dolor (13,31).

2.1.2 TIPOS HISTOLOGICOS DE CANCER DE PULMON.

Existen diversas clasificaciones histológicas de cáncer de pulmón, pero actualmente la que se toma en cuenta es la establecida por la Organización Mundial de la Salud en 1982 (26,30,34):

- I.- Carcinoma epidermoide.
- II.- Carcinoma de células pequeñas.
- III.- Adenocarcinoma.
 - 1. broncogénico.
 - 2. bronquioalveolar.
- IV.- Carcinoma de células grandes.
- V.- Carcinoma adenoescamoso.

Sin embargo, es importante notar que desde el punto de vista terapéutico lo crucial es decidir si se trata de una neoplasia de células pequeñas (probablemente de origen neuroendócrino ya que son positivas a la enolasa neurona específica) y aquellas de células no pequeñas (que incluyan al carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma adenoescamoso). Esta distinción puede ser realizada desde el estudio citológico del esputo. El diagnóstico definitivo será dado por el estudio de la pieza quirúrgica y/o la biopsia (13,26,30,34).

2.1.3 CLASIFICACION DEL CANCER PULMONAR POR ESTADIOS.

En el Instituto Nacional de Cancerología se emplea la clasificación internacional propuesta por Mountain, que toma en cuenta el tamaño y la localización del tumor primario, la invasión ganglionar y las metástasis a distancia, así que agrupa a los tumores en estadios del 0 al IV; teniendo gran importancia porque es un lenguaje de comunicación internacional, para planear el tratamiento para cada estadio, conocer el pronóstico y así permite hacer investigación clínica y terapéutica (11).

NUEVA CLASIFICACION TNM

- TX Tumor demostrado por células malignas en las secreciones bronquiales (citología positiva) que no se ve en la broncoscopia, ni se identifica en la radiografía o tumor no valorable como en casos de retratamiento.
- T0 Sin evidencia de tumor primario.
- Tis Carcinoma in situ.
- T1 Tumor de 3 cm como diámetro mayor rodeado de parénquima pulmonar que no invade pleura visceral, sin invasión proximal de un bronquio lobar observado en broncoscopia.
- T2 Tumor mayor de 3 cm o de cualquier tamaño que invade la pleura visceral con atelectasia o neumonitis obstructiva hasta el hilo lobar. En la broncoscopia visto dentro de un bronquio lobar o hasta 2 cm distal a la carina. Si existe atelectasia o neumonitis que no sea de todo el pulmón.
- T3 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared costal (tumor del surco superior sin Síndrome de Pancoast), diafragma, pleura mediastinal, pericardio, pero sin invadir corazón, grandes vasos, esófago y cuerpos vertebrales; o cualquier tumor a menos de 2 cm de la carina pero sin invadirla.

T4 Tumor de cualquier tamaño con invasión a estructuras del mediastino o corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales o carina; o derrame pleural maligno demostrado con citología positiva.

N INVASION GANGLIONAR

N0 Sin invasión ganglionar demostrable.

N1 Metástasis a los ganglios peribronquiales o hiliares ipsilaterales, incluyendo extensión directa del tumor hasta los ganglios.

N2 Metástasis a los ganglios mediastinales ipsilares y subcarinales.

N3 Metástasis a los ganglios hiliares y mediastinales colaterales, ganglios escalénicos o supravculares ipsilares o colaterales.

M METASTASIS A DISTANCIA

M0 Sin metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia especificando la localización entre paréntesis.

2.1.4 FACTORES PREDISONENTES EN EL CANCER DE PULMON.

Existen diversos factores de riesgo que se consideran de gran importancia para el cáncer de pulmón:

a) Personas con adicción al tabaco; diversos estudios muestran que el riesgo de contraer cáncer de pulmón aumenta en un 35 a 53 % en personas fumadoras.

b) Exposición a diversos agentes tales como: asbestos, níquel, cromatos, uranio, clorometil éter, cloruro de vinilo, arsénico, radón, cadmio y formaldehído entre otros.

- c) Enfermedades sistémicas como son la sarcoidosis (relacionada frecuentemente con adenocarcinoma), escleroderma y fibrosis intersticial.
- d) Dieta con deficiencia en vitamina A, vitamina E, beta-carotenos y zinc. Estudios recientes han informado que alimentos ricos en beta-carotenos, y otros constituyentes de vegetales verdes y amarillos, sean posiblemente agentes quimiopreventivos.
- e) Factores de riesgo genéticos o familiares.
- f) Humo de leña.

En México en los casos registrados en el Instituto Nacional de Cancerología sólo el 70% de los casos de cáncer pulmonar se presentan en fumadores, en comparación con el 90% de casos en fumadores observados en países desarrollados. Esta diferencia es importante y probablemente se debe a factores de dieta, genéticos y principalmente de contaminación ambiental que merece atención y estudio (13,19,23,34).

2.1.5 ADENOCARCINOMA PULMONAR.

El adenocarcinoma pulmonar es la estirpe histológica del cáncer de pulmón que puede surgir del epitelio bronquioalveolar o de las glándulas mucosas. La característica de diferenciación es la secreción de mucina. Estas células tienden a ser de forma cuboidal y presentan núcleos grandes vesiculares o irregulares con nucleolos prominentes y abundante citoplasma. La forma en que los adenocarcinomas se diseminan es por contigüidad a la pleura, vía linfática provocando metástasis a ganglios linfáticos escalenos o iliares (13,22,23,34).

2.1.6 GENERALIDADES DE LIQUIDO PLEURAL.

El líquido pleural se encuentra normalmente en pequeña cantidad en la cavidad pleural donde funciona como lubricante. en ciertas patologías puede acumularse mayor cantidad y dar síntomas

como dolor, dificultad para respirar y otras; para determinar la causa que lo produce, se tiene la ayuda de la historia clínica y del estudio citoquímico. En el cuadro 1 se muestran algunos ejemplos. Sin embargo esta larga batería de pruebas se puede simplificar con la observación microscópica del fluido, la cuantificación de proteínas totales y la densidad; esto generalmente es suficiente para determinar si se trata de un exudado o un trasudado. El trasudado es caracterizado por densidad abajo de 1.020 y la baja cantidad de proteínas; en esencia se trata de un ultrafiltrado de plasma sanguíneo que consiste principalmente de agua y electrolitos en disolución. Los trasudatos se forman por una alteración entre la relación normal de la presión capilar hidrostática y la presión coloidal osmótica, existiendo un aumento de la primera o disminución de la segunda. Su causa es principalmente insuficiencia cardíaca.

Los exudados se caracterizan por la alta concentración de proteínas y una densidad arriba de 1.020, habiendo además una alteración de la membrana capilar, la cual se encuentra anormal por cambios inflamatorios de la pleura. Los cuadros 2 y 3 muestran las diferentes causas que dan origen a los trasudados y a los exudados. Es indispensable sobre todo en los casos en que se sospecha la existencia de tumor, realizar el estudio citológico del líquido, ya que nos puede dar una indicación precisa del diagnóstico, por ejemplo, la presencia de células malignas (de adenocarcinoma, mesotelioma). El método habitual para la obtención de líquido pleural es la toracocentesis. Se puede hacer la biopsia pleural para ayudar a establecer un diagnóstico preciso; haciendo el estudio patológico y microbiológico (6,9).

CUADRO I

PRUEBAS UTILES EN LA EVALUACION DE LIQUIDO PLEURAL

PRUEBA	VALORES ANORMALES	ETIOLOGIA ASOCIADA
GLOBULOS ROJOS/mm ³	MAYOR A 100,000	MALIGNIDAD, TRAUMA, EMBOLIA PULMONAR
GLOBULOS BLANCOS/mm ³	MAYOR A 10,000	INFECCION
NEUTROFILOS %	MAYOR A 50	PLEURITIS AGUDA
LINFOCITOS %	MAYOR A 90	TUBERCULOSIS, MALIGNIDAD
EOSINOFILIA %	MAYOR A 10	EFUSINN POR ASBESTOS, NEUMOTORAX
CELULAS MESOTELIALES	AUSENCIA	POSTINFECCION
PROTEINAS PF/S	MAYOR A 0.5	TUBERCULOSIS
LDH PF/S	MAYOR A 0.6	EXUDADO
LDH IU	MAYOR A 200	EXUDADO
GLUCOSA mg/dl	MENOR A 60	EMPIEMA, TUBERCULOSIS, ARTRITIS REUMATOIDE
pH	MAYOR A 7.20	RUPTURA ESOFAGICA, EMPIEMA, TUBERCULOSIS, MALIGNIDAD, ARTRITIS REUMATOIDE
AMILASA PF/S	MAYOR A 1	PANCRITITIS
BACTERIAS	POSITIVO	ETIOLOGIA INFECCIOSA
CITOLOGIA	POSITIVA	DIAGNOSTICO DE MALIGNIDAD
DENSIDAD	MAYOR A 1.020	EXUDADO

PF/S = Fluido pleural/suero

IU = Concentración en unidades internacionales

CUADRO II
CAUSAS DE TRASUDADOS

- INSUFICIENCIA VENTRICULAR IZQUIERDA QUE
 - PRODUCE CONGESTION PULMONAR

 - SINDROME NEFROTICO

 - CIRROSIS

 - SINDROME DE MEIG'S

 - HIDRONEFROSIS

 - DIALISIS PERITONEAL
-

CUADRO III
CAUSAS DE EXUDADOS

- MAS FRECUENTES:
 - NEUMONIA EMPIEMA PARA NEUMONICO
 - MALIGNIDAD: a) TUMORES PRIMARIOS (MESOTELIOMA)
 - b) CANCER BRONCOGENICO
 - c) METASTASIS PULMONARES DE OTROS TIMORES
 - EXTRATORACICOS
 - EMBOLIA PULMONAR
 - COMUNES:
 - TUBERCULOSIS
 - TRAUMATISMO
 - ENFERMEDADES ABDOMINALES

 - RARAS:
 - DROGAS E.J. NITROFURANTOINA SARCOIDOSIS
 - ASBESTOS SINDROME DE DRESSLER
 - UREMIA RADIOTERAPIA
-

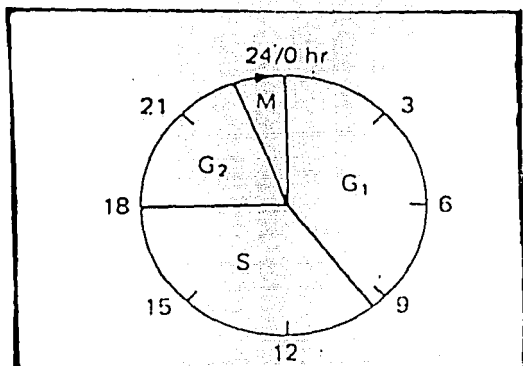
2.2 CITOGENETICA Y CANCER.

2.2.1 PRINCIPIOS GENERALES DE CITOGENETICA.

La citogenética es el estudio de la relación existente entre la estructura, el número de los cromosomas y el modo de conducirse durante la división celular, con el genotipo y fenotipo que presenta el individuo. Pero para hablar de citogenética es importante hacer mención del ciclo celular y más específicamente de la mitosis (1,3).

El ciclo celular se refiere a una serie de eventos ordenados de forma hipotética para el estudio de la vida celular y se ejemplifica en la figura 1. El intervalo correspondiente a la división o mitosis (M) es corto, mientras que el resto es la parte conocida como interfase. Durante esta última los cromosomas están alargados formando una fina red en el núcleo. En este período se realizan múltiples funciones como la síntesis proteica y hormonal. La fase G₁ o presintética se refiere a la preparación de la célula anterior a la síntesis de ADN. La fase S o sintética es el intervalo correspondiente a la replicación de los cromosomas, se lleva a cabo la síntesis de ADN. La fase G₂ es el intervalo posterior a la replicación en el que se hacen los preparativos para distribuir los conjuntos de cromosomas replicados a los núcleos hijos mediante la mitosis, este intervalo se conoce también como postsintético (4,8,28).

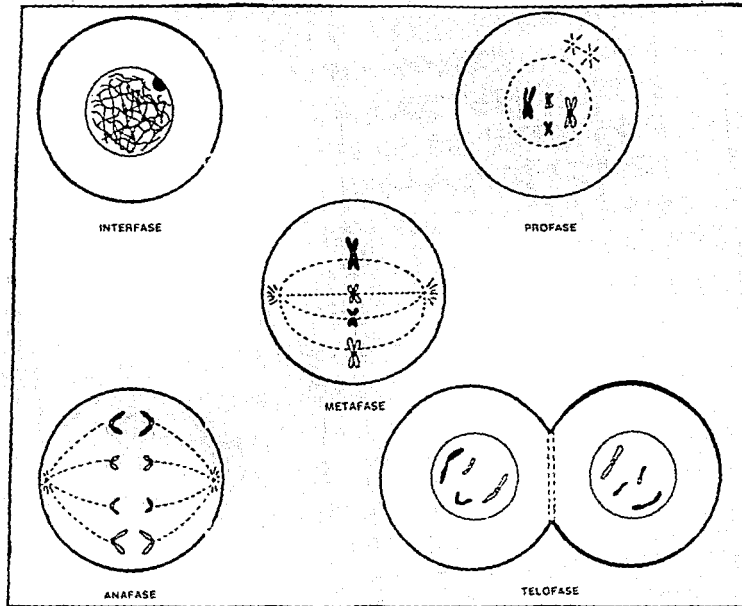
FIGURA 1.
CICLO CELULAR.



La mitosis es el proceso mediante el cual una célula da origen a dos células idénticas con igual dotación cromosómica. En el caso de las células somáticas humanas, cada célula que se divide, da lugar a dos células hijas con 46 cromosomas. La mitosis se ha dividido en 4 fases las cuales se definen por las características que van presentando los cromosomas (estas características se muestran en la figura 2) y son:

- a) **Profase:** En la cual los cromosomas que ya se habían duplicado en el periodo S del ciclo celular, se han ido acortando y aparecen como bastones compactos, por un proceso de espiralización. La membrana nuclear deja de hacerse visible y son aparentes los centriolos, los cuales se han duplicado y migran a polos opuestos de la célula. Los centriolos son los sitios donde se ensambla la tubulina, la cual es la subunidad proteica de los microtúbulos que formarán el huso acromático. Este comienza a aparecer entre los dos centriolos. A su vez el nucleolo también deja de hacerse visible.
- b) **Metafase:** Los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y aparecen unidos por el centrómero al huso acromático. En este estadio, mediante las técnicas de cultivo de tejidos y el empleo de sustancias como la colchicina, se pueden observar mejor los cromosomas al microscopio.
- c) **Anafase:** Ocurre la división longitudinal del centrómero, lo que permite que cada cromátide se separe y unida por su centrómero al huso acromático, migre hacia el polo respectivo de la célula.
- d) **Telofase:** Se forman dos núcleos hijos (cariocinesis) y el citoplasma también completa su división (citocinesis) mediante un plegamiento de la membrana que comienza desde la periferia, en la parte media, y va progresando hacia el centro de la célula, de tal suerte que finalmente se obtienen dos células hijas con igual dotación de cromosomas y de citoplasma (división ecuacional) (3,8,28).

FIGURA 2.
FASES DE LA MITOSIS.



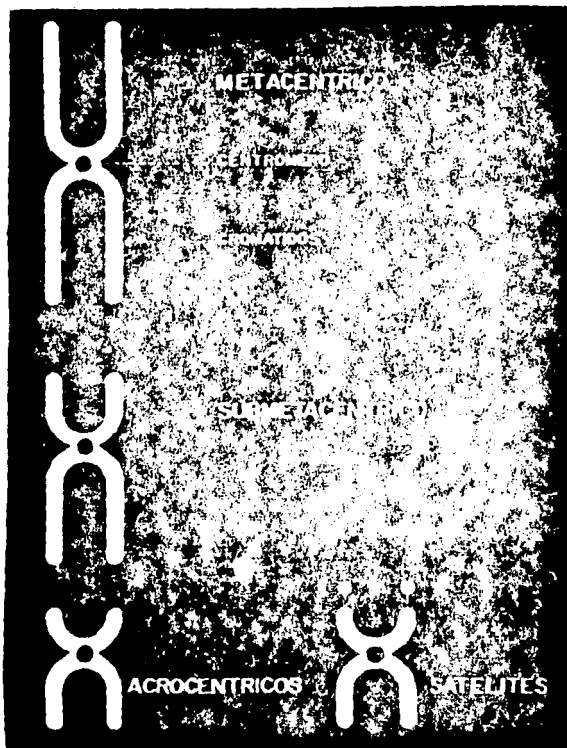
Si se realiza el cultivo celular de una biopsia, de un líquido corporal como por ejemplo sangre periférica o líquido pleural, y posteriormente se trata con agentes antimitóticos, se pueden observar los cromosomas al microscopio. Un cromosoma está constituido por ADN y proteínas, son los portadores de la información genética, y se encuentran en el núcleo de la célula. Estos tienen una estructura y morfología definida y están formados por dos cromátides que van unidas por el centrómero. Los cromosomas se analizan durante la profase tardía o durante la metafase. Y se clasifican dependiendo de la localización del centrómero (ejemplificado en la figura 3). Siendo esta clasificación la siguiente:

Metacéntrico: El centrómero se encuentra localizado en la parte media del cromosoma. Siendo los brazos de arriba p iguales a los de abajo q.

Submetacéntrico: El centrómero se encuentra más cerca de uno de los extremos del cromosoma. Siendo p menor que q.

Acrocéntrico: El centrómero está situado muy cerca a uno de los extremos quedando p muy corto en relación a q. Estos cromosomas pueden poseer satélites, los cuales son unas formaciones que recuerdan palillos de tambor (8,28).

FIGURA 3.
CLASIFICACION DE LOS CROMOSOMAS DEPENDIENDO DE LA LOCALIZACION DEL
CENTROMERO.



Cariotipo es el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y a la localización del centrómero. En base a esto y según la clasificación de Denver, existen 7 grupos que se designan por letras y son:

Grupo A: Pertenecen los pares 1, 2, y 3, siendo el 1 y el 3 metacéntricos y el 2 submetacéntrico.

Grupo B: Son los pares 4 y 5; ambos son submetacéntricos, p cabe 3 o más veces en q.

Grupo C: Están incluidos los pares del 6 al 12, todos submetacéntricos, el cromosoma x debido a su tamaño también está incluido en este grupo.

Grupo D: Son cromosomas acrocéntricos y son los pares 13, 14 y 15.

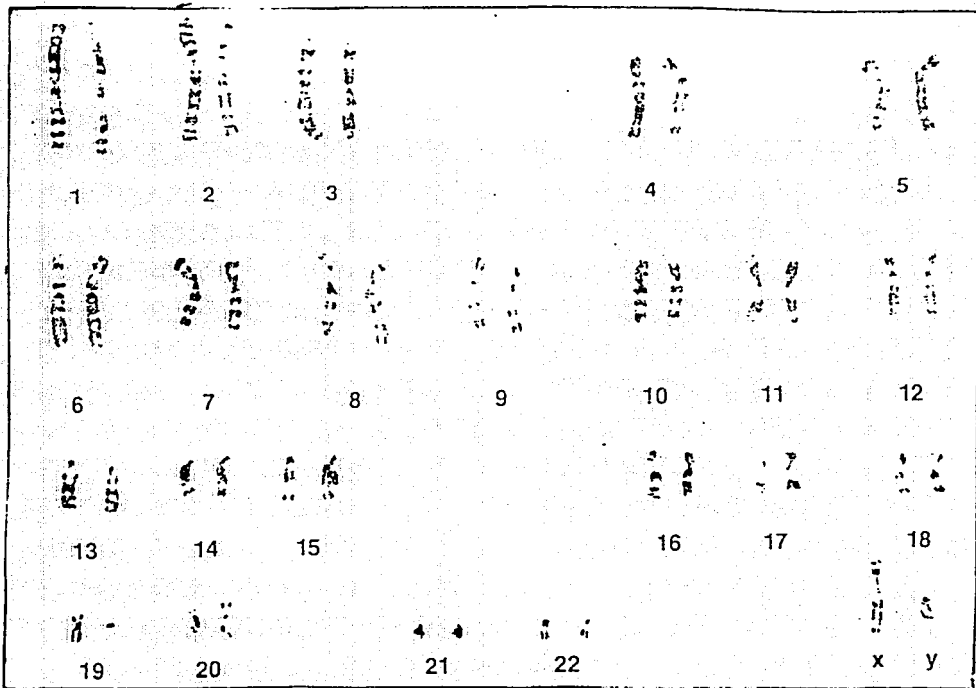
Grupo E: Formados por los pares 16, 17, y 18, siendo todos submetacéntricos.

Grupo F: Integrado por los pares 19 y 20; estos son pequeños y metacéntricos.

Grupo G: Están los pares acrocéntricos 21 y 22, siendo los más pequeños del cariotipo humano. En este grupo se incluye al cromosoma Y aunque carece de satélites.

Cabe mencionar que para poder identificar con exactitud cada par cromosómico hay que recurrir a diversas técnicas de bandeo; las cuales individualizan a cada cromosoma según el patrón de bandas correspondiente. Las técnicas de bandas además de ayudar a identificarlos, también son útiles en la búsqueda de diferentes alteraciones que pueden presentar los cromosomas, las más usadas son las bandas G, las bandas Q y las bandas R. En la figura 4, se puede apreciar un cariotipo masculino normal, teñido con la técnica de bandas Q (28)..

FIGURA 4
 CARIOTIPO MASCULINO NORMAL, TEÑIDO CON BANDAS Q..



2.2.2 FUNDAMENTO DE ALGUNAS TECNICAS DE INTERES UTILIZADAS EN CITOGENETICA.

Los elementos de soporte que dan forma a las células son los microtúbulos, estos se pueden encontrar en el citoesqueleto o en los husos mitóticos. Los microtúbulos están integrados por moléculas repetidas de tubulina, proteína globular que consta de dos subunidades. Existen diferentes agentes conocidos con el nombre de antimitóticos, los cuales tienen la capacidad de inhibir la división en las células eucariotas. Estos son el alcaloide colchicina, así como también los productos de mohos vinblastina y vincristina (16). La colchicina es un alcaloide obtenido de Colchicum autumnale (L, Liliacea), tiene aspecto de agujas de color amarillo opaco, se oscurece con la luz y es soluble en agua. Interfiere en la formación de los microtúbulos uniéndose a la tubulina, desplazando así al nucleótido de guanina adherido e inhibiendo la polimerización correspondiente. En cambio, la vincristina interfiere en la formación de microtúbulos provocando la precipitación de la tubulina y formando un polímero tridimensional con una ordenación molecular muy distinta de la estructura normal del microtúbulo (16,33).

Para el estudio citogenético habitual, las células obtenidas directamente del espécimen y las del cultivo, reciben tratamiento con colchicina, después con solución hipotónica (la cual tiene como objetivo hipotonizar las células para que los cromosomas se dispersen mejor), posteriormente se ponen en contacto con la solución de Carnoy (la cual detiene la acción de la solución hipotónica y fija las células). Para visualizar los cromosomas se deben crear laminillas, para esto se utilizan diferentes técnicas como son: dejar caer las gotas de la suspensión celular a una distancia determinada sobre la laminilla tratada con alcohol al 70 % y flamearla logrando una mejor distribución de los cromosomas para la observación microscópica (28).

Debido a que el estudio citogenético requiere de cultivo celular, es importante estudiar las condiciones óptimas para su crecimiento, lo que incluye:

1.- Presión osmótica: En células de mamíferos a 37°C es aproximadamente de 7.6 atm, esta presión es regulada y mantenida por algunos iones inorgánicos como el Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻, PO₄⁻ y CO₃.

2.- pH: La mayoría de las células toleran un pH de 6.8 a 7.8 siendo el rango óptimo de 7.3 a 7.4, aunque algunas células requieren un pH más ácido o más alcalino. En solución el pH es regulado por sustancias amortiguadoras.

3.- Energía: La principal fuente de energía para las células, son los carbohidratos, siendo el principal la glucosa, aunque algunas veces se utiliza también el lactato o el piruvato.

4.- Oxígeno y dióxido de carbono: Son fundamentales en el medio de cultivo celular, el oxígeno se encuentra dentro del medio de cultivo y el dióxido de carbono es proporcionado en forma externa a las células con una atmósfera del 5 al 7 % de CO₂.

5.- Antibiótico: Se pueden añadir al cultivo celular con el fin de que no exista contaminación.

Después del cultivo es necesario tripsinizar las células con EDTA, el cual forma un complejo quelante que captura al calcio presente en el medio de cultivo y en la membrana plasmática de la célula. Esto con la finalidad de despegar fácilmente a las células del envase de cultivo.

Después de la tripsinización se adiciona una sustancia amortiguadora en la botella de cultivo por 15 segundos para lavar las células eliminando la Tripsina y con el medio de cultivo se inhibe la acción de la tripsina restante, impidiendo que dañe o maltrate las células rompiendo su membrana.

La viabilidad se determina con el colorante azul de tripano que es un colorante vital y tiñe solamente a las células muertas ya que al disminuir el metabolismo se permite la entrada del colorante tiñendo carbohidratos y proteínas. En el caso de las células vivas, el alto metabolismo de los carbohidratos impide la tinción de las células (4,8,25,28,29).

Técnicas de bandas; Existen diversas técnicas de bandas, como son las Q, G, R, C, T, entre otras.

Las más empleadas son las bandas Q y G.

Las bandas Q fueron establecidas por Caspersson y cols. quienes utilizaron mostaza de quinacrina como tinción, con lo cual observaron que los cromosomas estaban constituidos por una secuencia de segmentos fluorescentes y no fluorescentes, siendo idéntico el patrón en los cromosomas homólogos. A esta secuencia de bandas se les denominó Q por el agente fluorocrómico. Esta afinidad que presentan se debe a la prevalencia de pares Adenina-Timina (A-T) en las áreas que muestran fluorescencia más intensa.

Con el empleo de enzimas proteolíticas como la tripsina o quimiolripsina que actúan directamente sobre las histonas que rodean al ADN, se logra observar bandas G. Se utiliza como colorante GEMSA y de ahí reciben su nombre.

Las bandas R o reversa se observan por la desnaturalización con calor y renaturalización controlada. En este caso las bandas son la imagen en negativo de las bandas Q y G.

Las bandas T demuestran la porción telomérica del cromosoma (extremos de los cromosomas), se aprecian usando naranja de acridina (28,29).

2.2.3 RELACION ENTRE CITOGENETICA Y CANCER

Desde los años 60 se demostró que existen alteraciones cromosómicas constantes en ciertos tipos de tumores. A partir de los años 70 y 80, se descubrieron mutaciones específicas en protooncogenes que dan lugar a la transformación celular; de tal forma que se ha podido entender la importancia de la citogenética en el estudio de las neoplasias. Actualmente existen traslocaciones, deleciones y/o amplificaciones genéticas que permiten ayudar en el diagnóstico, seguir a los pacientes e incluso predecir el pronóstico de ellos. Por lo que cada vez va teniendo mayor importancia el estudio citogenético en los pacientes con cáncer.

La mayoría de estos estudios se han realizado en tumores líquidos como las leucemias; sin embargo, en los últimos años se ha puesto un especial interés en el estudio de tumores sólidos

encontrando una mayor diferenciación en la obtención de un material adecuado y suficiente para efectuar el análisis citogenético.

Existe una nomenclatura específica para designar las alteraciones encontradas con mayor frecuencia en los estudios citogenéticos e incluyen:

- Hiperdiploidías.- Aumento el número de cromosomas.
- Hipodiploidías.- Disminución el número de cromosomas.
- Pseudodiploidías.- Contienen un número normal aparente de cromosomas pero con aberraciones estructurales.
- Endorreduplicaciones.- Los cromosomas se duplican pero no se separan.
- Dobles minutas.- Abreviado como d min., características de las células tumorales y corresponden a amplificación de ADN repetitivo.
- Marcador.- Es un cromosoma que no se ubica en ninguno de los patrones de banda definidos.
- Gap cromatídico.- Es una región no teñida de una sola cromátida en donde la unión de esta región y la cromátide es mínima.
- Gap cromosómico.- Región no teñida de ambas cromátides en el mismo locus, en donde la unión de las cromátidas y esta región es mínima.
- Cromosomas en anillo.- Se forman cuando ocurre una ruptura en ambos brazos cromosómicos y los extremos pegajosos se unen entre sí (2,12,19,28,29).
- Traslocación.- Intercambio de segmentos entre cromosomas no homólogos.
- Trisomía.- Presencia de un cromosoma adicional.
- Delección.- Forma de aberración de Los cromosomas en la cual se pierde una parte de estos.

2.3 CANCER DE PULMON Y CITOGENETICA.

2.3.1 PRINCIPALES HALLAZGOS CITOGENETICOS EN EL CANCER DE PULMON

La mayoría de los hallazgos citogenéticos realizados en cáncer de pulmón se han efectuado en cáncer pulmonar de células pequeñas, en donde se han encontrado con gran frecuencia una alteración del cromosoma 3p (en la banda 14, 23), pero esta alteración no es la única, también se tienen reportes de la pérdida del cromosoma 13, anormalidades de los cromosomas 1, 3, 5, 6, 11 y 17; además de cromosomas en anillo, dobles minutas, cromosomas marcadores, rompimientos cromosómicos y cromatídicos y gaps (14,17,18,35).

Los estudios citogenéticos del cáncer de pulmón de células no pequeñas son muy escasos y las alteraciones encontradas no son específicas. Más aún, en las diferentes estirpes histológicas también se ha reportado la alteración 3p (14-23) (generalmente en Adenocarcinoma pulmonar y escamoso). Otras alteraciones incluyen dobles minutas, hiper e hipodiploidías, marcadores, rompimientos, gaps y alteraciones inespecíficas en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, y 20 (14, 29, 30, 32).

2.3.2 CITOGENETICA EN ADENOCARCINOMA PULMONAR.

Las alteraciones presentes en Adenocarcinoma pulmonar no son específicas, y son las mencionadas en el punto 2.3.1. Lo que con frecuencia se ha encontrado, es una pobre respuesta a los agentes antimetabólicos para la obtención y estudio de los cromosomas. En general se observan pocas mitosis y de mala calidad. El éxito para la obtención de material adecuado va desde 18 a 32 % (1,5,29,30,32).

2.3.3 ESTUDIO CITOGENETICO EN LIQUIDO PLEURAL.

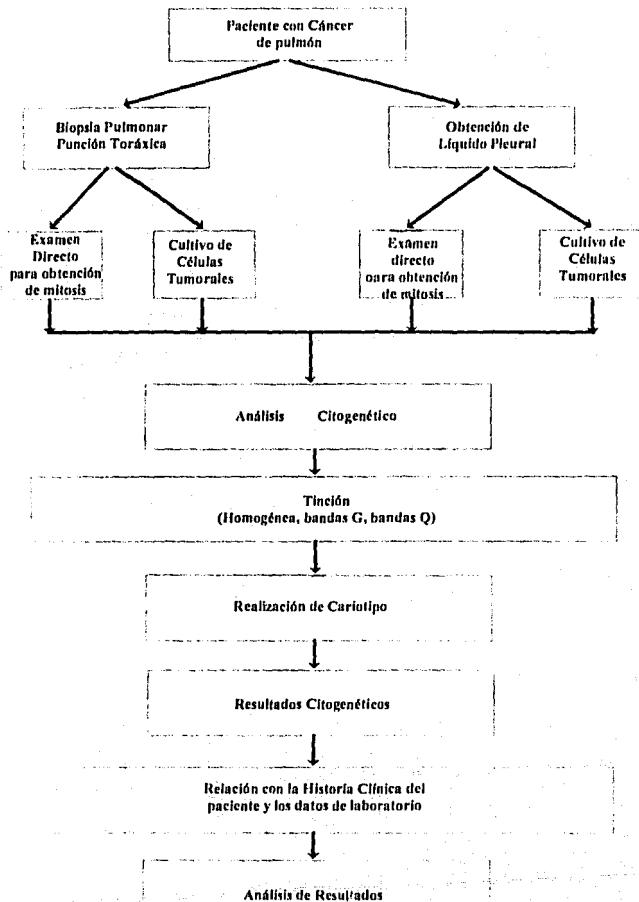
Existe poca información acerca del estudio citogenético de líquido pleural. sin embargo se sabe que pueden presentar con frecuencia un alto índice mitótico. El estudio del líquido pleural maligno no sólo

nos puede enseñar acerca del tumor primario pulmonar, sino también del tipo de alteraciones citogenéticas encontradas en células que han tenido la capacidad de invadir y dar metástasis (29).

CAPITULO III

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

- Líquido pleural y biopsia pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón, proporcionadas por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y el Instituto Nacional de Cancerología.
- Suero fetal bovino (SIGMA, No. Cat. F 4884).

3.2.3 MATERIAL DE LABORATORIO:

- Pipetas Pasteur.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.
- Vasos de precipitado de 250 y 450 ml.
- Probetas de vidrio de 50 y 100 ml.
- Vasos de Koplik.
- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm.
- Viales de vidrio estériles de 5 ml.
- Cajas de Petri de 60 mm².
- Matraces aforados de 100, 500 y 1000 ml.
- Porta objetos (26 x 76 mm).
- Cubreobjetos (24 x 50 mm).
- Termómetro (-10 a 100°C).
- Goteros.
- Pisetas.
- Pinza larga de disección.
- Tubos para centrífuga cónicos estériles (15 ml).
- Jeringas de 5 y 10 ml.

- Agujas (27 x 13 mm).
- Lámparas de alcohol.
- Gradillas.
- Gasas estériles.
- Guantes estériles.
- Cubre bocas.
- Tubos de Vacutainer con Heparina sódica.
- Reloj de intervalos.
- Frascos T-25 (NUNC).
- Espátula.
- Papel filtro.
- Embudo.
- Papel parafilm.
- Micropipeta de 0.100 ml y 1 ml (Gilson).
- Filtros para esterilización de 0.220 (Millipore).
- Unidad de filtración (Millipore).

3.2.3 REACTIVOS

- Medio de cultivo Mc COY'S 5A (GIBCO No Cat. 320-6620 A G).
- Medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA No. Cat. R-6504).
- L-Glutamina (G.A) (SIGMA No. Cat. G 500).
- Piruvato de sodio (G.A) (SIGMA No. Cat. G 500).
- Solución de Antibióticos: (Penicilina 10 unidades, Estreptomicina 10 mg y Anfotericina-B 25 mg). (SIGMA No. Cat. G 500).

- Dextrosa (G.A.) (SIGMA).
- Bicarbonato de sodio (G.A.) (J.T. Baker).
- Etanol absoluto (Alta Distribución).
- Metanol absoluto (Alta Distribución).
- Cloruro de sodio (G.R.) (SIGMA).
- Cloruro de potasio (G.R.) (SIGMA).
- Fosfato de potasio monobásico (G.A.) (J.T. Baker No. Cat. 3818).
- Fosfato de potasio dibásico (G.A.) (J.T. Baker No. Cat. 3828).
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (G.R.) (J.T. Baker).
- Azul de tripano (G.R.) (SIGMA).
- Wright (G.R.) (Merck).
- GIEMSA (G.R.) (Merck).
- EDTA (G.R.) Merck).
- Tripsina de páncreas bovino (SIGMA T0646).
- Tripsina de porcino (GIBCO No. Cat. 840-725 oil).
- Colchicina (G.R.) (SIGMA No. Cat. 9754).
- Agua desionizada estéril.
- Agua destilada.
- Xilol (G.A.) (Laboratorios Laitz).
- Quinacrina (Dehidroxiclorada) (G.R.) (SIGMA).
- Ácido acético glacial (G.R.) (J.T. Baker).
- Aceite de inmersión (Merck).
- Glicerina (G.R.) (Reproquifin).

NOTA: G.A = Grado analítico. G.R. = Grado reactivo.

3.2.4 EQUIPO.

- Baño María (MAPSA, Modelo BMT4).
- Campana de flujo laminar vertical (VECO).
- Campana con luz ultravioleta (Fabricada en el INCAN).
- Refrigerador.
- Centrífuga clínica y unidad de refrigeración (BECKMAN, Modelo TJ-6).
- Centrífuga clínica (INTERNATIONAL EQUIPMENT CO., Modelo MASS 02194).
- Estufa de cultivo (RÍOS ROCHA, Modelo EC-41).
- Incubador de cultivo (NAPCO, Modelo 188).
- Microscopio invertido con contraste de fase (REITCHERT, BIOSTART).
- Microscopio de contraste de fase (NIKON, Modelo 01740).
- Fotomicroscopio y de fluorescencia (NIKON, Modelo 020727).
- Balanza analítica (METTLER ZURICH, Modelo SS-11-143712).

3.3 METODOLOGIA.

Se trabajaron muestras de pacientes proporcionadas por el Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias (INER) y el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), los cultivos celulares fueron realizados en el INER; el examen directo, la obtención de mitosis y la realización de los cariotipos fueron efectuados en el INCAN.

Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta fueron:

A) Se incluyeron únicamente los pacientes con diagnóstico histopatológico y/o citológico de cáncer de pulmón variedad Adenocarcinoma. (El diagnóstico histopatológico fue realizado por el departamento de Patología del INER y del INCAN).

B) Quedaron excluidos del estudio todos aquellos pacientes con algún otro tipo de padecimiento oncológico o que hayan tenido metástasis a pulmón.

C) No se tomaron en cuenta la edad ni el sexo de los pacientes.

D) Fueron seleccionados únicamente pacientes sin tratamiento quimioterapéutico.

Del expediente de cada uno de los pacientes se tomaron en cuenta los siguientes datos:

a) Edad.

b) Sexo.

c) Reporte final de Patología y/o Citología.

d) Estadio clínico.

e) Duración del cuadro clínico.

f) Sobrevida.

g) Adicción a tabaco, alcohol u otras drogas.

h) Antecedentes de pérdida de peso.

i) Síntomas (tos y expectoración, disnea y dolor torácico).

j) Exposición a algún agente tóxico.

k) Lugar de origen y de residencia.

l) Datos de laboratorio clínico: Hemoglobina (Hb), Plaquetas (Plq), Leucocitos (GB), Deshidrogenasa láctica (LDH), Aspartato amino transferasa (AST), y estudio citoquímico de líquido pleural (L.P).

3.3.1 RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE LA BIOPSIA Y LIQUIDO PLEURAL.

1.-Obtener una biopsia de pulmón por medio de punción torácica (con aguja de TRU CUT), y colocar cada muestra por separado, en un tubo cónico estéril para su transporte. (Todos los procedimientos posteriores se llevarán a cabo bajo condiciones de esterilidad).

2.- a) Con la finalidad de obtener una suspensión celular, colocar la biopsia en una caja de Petri de 60 mm² y disgregar los fragmentos por acción mecánica, con la ayuda de una aguja (27 x 13 mm). Colocarla nuevamente en un tubo cónico y dejarla reposar por espacio de 3 min., para permitir que sedimenten los fragmentos grandes de tejido.

b) Centrifugar el líquido pleural a 138 G por 10 min. a 4°C; transcurrido el tiempo, retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular; adicionar 1 ml de agua destilada y 9 ml de amortiguador de fosfatos, con el propósito de producir un choque hipotónico que lise los eritrocitos. Centrifugar el tubo como en el paso anterior y resuspender el botón celular en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado.

3.- De los tubos obtenidos en el paso anterior (a y b), tomar 3 ml de cada uno de los tubos, para realizar el examen directo.

Los 2 tubos (a y b) restantes, llevarlos a un volumen final de 5 ml con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado, con el objeto de realizar el cultivo celular.

3.3.1.1 EXAMEN DIRECTO.

1.- Los tubos destinados para el examen directo, ponerlos en el baño María a 37°C, adicionarles 500 μ l de colchicina y dejar incubar durante 1 hora.

2.- Transcurrido el tiempo, centrifugar los tubos por 5 min a 384 G a temperatura ambiente.

3.- Desechar el sobrenadante y agregar 10 ml de solución hipnótica durante 30 min. a 37°C y posteriormente centrifugar 5 min. a 384 G.

4.- Desechar el sobrenadante, resuspender el botón y adicionar 5 ml de solución de Carnoy. Realizar de 3 a 4 lavados hasta que el sobrenadante quede completamente transparente.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS.

4.1.1 DATOS DEMOGRAFICOS

El estudio se realizó con un total de 12 pacientes de ambos sexos, de los cuales el 50% (6) fueron mujeres y el resto 50% (6) hombres, el rango de edades fluctuó entre los 48 y los 80 años, con un promedio de 68 años. En el Cuadro 1 se presentan los datos sobre el origen y residencia de los pacientes.

- 5.- Quitar aproximadamente 4.5 ml del sobrenadante (la cantidad depende del tamaño del botón celular) y dejar caer desde una altura aproximada de 30 cm, 4 gotas de la suspensión celular sobre laminas frías conservadas en alcohol al 70%, y flamearlas con lámpara de alcohol.
- 6.- Observar las laminas al microscopio de contraste de fases y buscar las células en matease (anotando sus coordenadas).

3.3.1.2 CULTIVO CELULAR.

- 1.- De los tubos destinados al cultivo celular, tomar 3 ml y colocarlos en un frasco T-25 y llevarlos a un volumen final de 5 ml e incubar a 37°C, con 5% de CO₂ y bajo una atmósfera húmeda, por 6 días.
- 2.- Transcurrido este tiempo, recuperar las células del frasco en un tubo, colocar los tubos en baño María a 37°C y realizar los mismos pasos que en el examen directo (1 a 6).
- 3.- Los 2 ml restantes del paso 1 del 3.3.1.2, ajustarlos a 5 ml con medio de cultivo RPMI-1640 y colocarlos en un frasco T-25 e incubar las células a 37°C con 5% de CO₂ bajo una atmósfera húmeda, hasta alcanzar una densidad de un millón de células. (El número y la viabilidad celular son determinadas por medio de coloración con azul de tripano al 0.4%).
- 4.- Posteriormente tripsinizar las células mediante los siguientes pasos:
 - a) Retirar el medio de cultivo por aspiración con pipeta Pasteur e impregnar las células adheridas con 1 ml de solución de EDTA para una botella T-25 (por inclinación).
 - b) Inmediatamente aspirar la solución con pipeta Pasteur y adicionar 1 ml de solución de tripsina-EDTA e incubar 1 min. a 37°C.
 - c) Transcurrido el tiempo, añadir 9 ml de amortiguador de fosfatos.
 - d) Recuperar las células del frasco en un tubo cónico y centrifugar a 138 G durante 10 min. a 4°C.
 - e) Desechar el sobrenadante y resuspender el botón celular con 5 ml de medio RPMI-1640.

5.- Colocar los tubos en baño María a 37°C y realizar nuevamente los pasos del examen directo (1 al 6).

6.- Una vez observadas y evaluadas todas las laminabas bajo el microscopio de contraste de fases, teñir las laminabas por tinción homogénea, bandas G o bandas Q (La selección de la tinción dependerá de la calidad y la cantidad de mitosis).

3.3.1.3 TINCIONES.

A) Tinción homogénea.- Colocar en un vaso de koplík, 50 ml de la solución de trabajo de GIEMSA y en dos vasos de precipitados de 250 ml, metanol al 5% y agua destilada respectivamente. Poner las laminillas en el colorante durante 3 min. y posteriormente pasarlas por el metanol y el agua destilada rápidamente. Observar las laminillas al microscopio con el objetivo de seco débil y posteriormente con el objetivo de 100 x con aceite de inmersión, seleccionar las mitosis y tomar las fotografías.

B) Bandas Q.- Colocar las laminillas en la solución de quinacrína por espacio de 15 min. Después de este tiempo, pasar las laminillas por 3 vasos de precipitados que contengan cada uno la solución hecha con 20 ml de solución A, 28 ml de solución B y 154 ml de agua destilada; observar las laminillas con fluorescencia, seleccionar las mitosis y tomar las fotografías.

C) Bandas G.- Colocar las laminillas en la solución de tripsina por espacio de 5 a 10 seg. y pasarlas a alcohol de 75%, observarlas bajo el microscopio de contraste de fases y si los núcleos y los cromosomas están bien tripsinizados, teñirlos con solución de trabajo de GIEMSA durante otros 3 min. transcurrido este tiempo, pasar las laminillas a metanol al 5 % y en agua destilada rápidamente. Observar las laminillas con aceite de inmersión, seleccionar las metafases y tomar las fotografías.

3.3.1.4 CARIOTIPOS.

Con las fotografías de las metafases obtenidas en los pasos anteriores, realizar y analizar los cariotipos.

CAPITULO IV

DATOS GENERALES DE LOS PACIENTES

CUADRO # 1

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO	ORIGEN	RESIDENCIA
1	73	M	HIDALGO	HIDALGO
2	76	M	TLAXCALA	MORELOS
3	72	F	QUERETARO	QUERETARO
4	61	F	VERACRUZ	VERACRUZ
5	74	F	EDO. DE MEX.	EDO. DE MEX.
6	60	F	D.F.	EDO. DE MEX.
7	48	M	HIDALGO	HIDALGO
8	65	M	GUANAJUATO	D.F.
9	74	F	HIDALGO	D.F.
10	57	M	MICHOACAN	EDO. DE MEX.
11	77	M	EDO. DE MEX.	GUADALAJARA
12	80	F	HIDALGO	D.F.

4.1.2 PROBABLES FACTORES PREDISPONENTES

Al analizar los antecedentes de importancia se encontró que 6 pacientes (50%) eran fumadores de estos 5 eran hombres con adicción intensa y una mujer con adicción moderada, 4 casos presentaron alcoholismo moderado, todos del sexo masculino. Se observó que 4 mujeres y 3 hombres (58.33%) estuvieron expuestos a humo de leña (variando entre 40 y 70 años de exposición en la mayoría de los casos), dos hombres además de exponerse a humo de leña presentaron exposición a asbestos. Un hombre estuvo expuesto a pesticidas y uno más a polvos provenientes de una mina. Dos mujeres y un varón no presentaron ningún factor de riesgo específico, pero este último era fumador intenso (Ver cuadro 2).

PROBABLES FACTORES PREDISPONENTES

CUADRO # 2

PACIENTE	TABAQUISMO	ALCOHOLISMO	EXPOSICIÓN A
1	++++	++	HUMO DE LEÑA
2	-	-	HUMO DE LEÑA Y ASBESTOS
3	-	-	HUMO DE LEÑA
4	++	-	HUMO DE LEÑA
5	-	-	HUMO DE LEÑA
6	-	-	HUMO DE LEÑA Y CARBÓN
7	++++	+++	PESTICIDAS
8	++++	++++	HUMO DE LEÑA Y ASBESTOS
9	-	-	-
10	++++	+	-
11	++++	-	POLVOS, MURCIÉLAGOS
12	-	-	-

4.1.3 HISTOPATOLOGIA

El diagnóstico se realizó en nueve pacientes a través de biopsia transtorácica y en tres pacientes por medio de citología. En todos el diagnóstico histológico fue de Adenocarcinoma, excepto en el caso 3 en el que fue imposible hacer la distinción entre Adenocarcinoma y Mesotelioma. Los doce pacientes se encontraron en estadio IV ya que presentaron extensión a pared torácica con diseminación a pleura. Debido a esto, ningún paciente recibió. El tiempo de seguimiento de los pacientes recopilados desde la toma de muestra hasta el último contacto que se tuvo con el paciente fue de 1 día a 4 meses con una media de 24 días. Estos datos se pueden apreciar en el cuadro 3.

HISTOPATOLOGIA

CUADRO # 3

PACIENTE	DIAGNÓSTICO DE PATOLOGÍA
1	Adeno Ca. poco diferenciado
2	Adeno Ca. Moderadamente diferenciado
3	Adeno Ca. VS. Mesotelioma maligno
4	Adeno Ca. En sitio no específico
5	Adeno Ca. Moderadamente diferenciado con metástasis a pleura
6	Adenocarcinoma
7	Citología.- Células neoplásicas malignas sugestivas de adenocarcinoma
8	Adeno Ca. Moderadamente diferenciado en pleura
9	Citología.- Adenocarcinoma
10	Probable adenocarcinoma
11	Biopsia y citología Adenocarcinoma
12	Citología.- Líquido pleural Adenocarcinoma

Adeno Ca.- Adenocarcinoma

Todos Los pacientes eran estadio IV

4.1.4 SINTOMAS, SIGNOS Y DURACION DEL CUADRO CLINICO

Dentro del cuadro clínico, el dato que se presentó en diez de los pacientes, fue tos con expectoración (en dos casos con hemoptisis), diez con disnea, ocho con dolor torácico, nueve presentaron pérdida de peso. Los pacientes asignados como 8 y 9 fallecieron poco después de realizarles la toma de la biopsia y estos fueron los que presentaron mayor pérdida de Kgs/mes (39 y 14 Kgs. respectivamente). La duración de los síntomas antes del diagnóstico, tuvo un rango de 1 a 24 meses(ver cuadro 4).

SINTOMAS, SIGNOS Y DURACION DEL CUADRO CLINICO

CUADRO # 4

PACIENTE	TOS Y EXPECTORACION	DISNEA	DOLOR TORACICO	PERDIDA DE PESO	DURACION DEL CUADRO CLINICO
1	SI	SI	NO	12Kgs	2 meses
2	NO	SI	NO	3 meses	2 meses
3	SI	SI	SI	-	1 mes
4	SI	SI	SI	10Kgs	12 meses
5	SI	SI	SI	1 mes	12 meses
6	SI	SI	SI	4 Kgs	18 meses
7	SI	SI	NO	2 meses	8 meses
8	SI	SI	SI	SI	4 meses
9	NO	NO	SI	20Kgs	12 meses
10	SI	NO	NO	6 meses	1 mes
11	SI	SI	SI	5Kgs	24 meses
12	SI	SI	SI	39Kgs	3 meses

* Estos datos fueron tomados al momento de acudir los pacientes al Instituto.

4.1.6 RESULTADOS DE LABORATORIO

Los parámetros de laboratorio tomados en cuenta, fueron los obtenidos antes de la biopsia, para así valorar el estado general del paciente.

La hemoglobina en la mayoría de los casos se encontró normal, con una media de 14.66 gr/dl con un intervalo de 11.1 a 20.9 (Valor de referencia: Hombres de 14 a 18, Mujeres de 12 a 16 gr/dl). Los glóbulos blancos y las plaquetas presentaron valores normales, para los glóbulos blancos se encontró una media de 9.88 miles/mm³ con un intervalo de 6.9 a 17.6 (Valor de referencia 4.8-10.8) y para las plaquetas una media de 268 con un rango de 73 a 421 (valor de referencia 130 - 400 miles/mm³).

No en todos los casos se obtuvo la LDH y la AST (7/12), encontrándose elevada en 4 pacientes, lo cual nos indica gran masa tumoral y la posibilidad de metástasis. La LDH presentó una media de 466 con un rango de 26 - 1785 (Valor de referencia 101 - 206 U/L) para AST una media de 57 con un rango de 14 a 130 (Valor de referencia 8 - 46 U/L) (Véase Cuadro No. 5).

RESULTADOS DE LABORATORIO

CUADRO # 5

PACIENTE	HEMOGLOBINA gr/dl	PLAQUETAS miles/mm ³	LEUCOCITOS miles/mm ³	LDH UI/L	AST UI/L
1	14.4	136	7.3	132	22
2	15.3	421	10.7	-	-
3	11.4	275	10.4	1785	130
4	13.1	278	9.86	333	14
5	13.7	376	7.9	489	20
6	13.8	238	9.3	-	74
7	11.1	301	6.9	-	108
8	20.9	73	-	360	34
9	13.8	193	7.9	136	22
10	18.1	333	17.6	26	117
11	14.3	376	13.2	-	29
12	16.1	215	7.7	-	-

LDH.- Deshidrogenasa láctica.

AST.- Aspartato amino transferasa

4.1.6 ESTUDIO CITOQUIMICO DE LIQUIDO PLEURAL

En el cuadro No. 6 se presentan los resultados de los estudios citoquímicos de los líquidos pleurales.

Tomando en cuenta todos los parámetros en conjunto, se observa que sólo un paciente presentó un trasudado, mientras que los pacientes restantes presentaron exudados.

La media y los intervalos de los parámetros contemplados fueron los siguientes:

	GLUCOSA	PT	Δ	LDH	LINFOCITOS
	mg/dl	mg/dl		U/L	%
MEDIA	84.6	3466.66	1.026	1138.42	58.93
INTERVALO	20-177	800-4700	1.015-1.036	220-345	22.7-93

Debido a que es muy poca la cantidad de líquido pleural, se consideran como valores de referencia los encontrados en suero (15).

CITOQUIMICO DE LIQUIDO PLEURAL

CUADRO # 6

PACIENTE	COLOR	ASPECTO	GLUCOSA mg/dl	P.T. mg/dl	ϖ	LDH UI/L	LINFOCITOS %
1	AMARILLO AMBAR	SEROFIBRINOSO	37	4300	1.029	235	82.1
2	AMARILLO ROJIZO	HEMATICO	34	4100	1.030	1258	54.4
3	AMARILLO CITRILO	SEROFIBRO- HEMATICO	20	4100	1.024	3459	22.7
4	AMARILLO CITRILO	SEROFIBRINOSO	60	3400	1.025	220	62.7
5	AMARILLO CLARO	SEROSO	90	1500	1.018	1235	46.0
6	ROJIZO	SEROHEMATICO	177	4600	1.030	-	66.4
7	AMARILLO CLARO	SEROSO	101	800	1.015	-	48.2
8	AMARILLO ROJIZO	SEROFIBRINOSO	99	4700	1.028	1128	54.9
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	AMARILLO	HEMATICO	144	3700	1.036	434	93.0

P.T.- Proteinas totales

ϖ.- Densidad

LDH.- Deshidrogenasa Láctica

4.1.7 ESTUDIO CITOGENETICO

En los cuadros 7 y 8 se presentan los resultados citogenéticos de los pacientes. Es importante notar que no a todos los casos se les hicieron ambas muestras, pero si a todos se les realizó estudio citogenético en alguno de los especímenes.

Paciente No. 1. En el examen directo de la biopsia no hubo metafases, se realizó el estudio citogenético en el cultivo de la biopsia pulmonar, obteniendo 5 mitosis, las que no fueron evaluables encontrándose estas células en anafase. No se realizó estudio de líquido pleural.

Paciente No. 2. En las células correspondientes al examen directo solamente se encontró una célula hiperdiploide mostrando 75 cromosomas (condición propia de las células tumorales). En el cultivo no se encontraron metafases. No se realizó estudio de líquido pleural.

Paciente No. 3. En el cultivo no se encontraron metafases. En dicho paciente se obtuvo respuesta en el examen directo, analizando 8 células hiperdiploides. Se encontró una mitosis hiperdiploide (5N), también se observaron alteraciones estructurales tales como dobles minutas en 3 células, 2 cromosomas marcadores en una célula (característicos de este tipo de patología) así como rompimiento cromatídico en una célula y rompimiento cromosómico en otra. No se realizó estudio de líquido pleural.

Paciente No. 4 y 5. En estos pacientes no se obtuvo respuesta en ninguna de las muestras (biopsia), esto se refiere a que no se encontraron células en metafase para el análisis citogenético. No se realizó estudio de líquido pleural.

Paciente No. 6. En el estudio directo de la biopsia se encontraron 3 células femeninas de 46 cromosomas aparentemente sin alguna alteración numérica ni estructural. Analizando las células del cultivo del líquido pleural se encontraron rompimientos cromatídicos en el 18.18 %, así como también gaps en el 27.27 %.

Paciente No. 7. Fueron realizados tanto el examen directo como el cultivo de la biopsia y del líquido pleural, en ninguno se obtuvieron metafases.

Paciente No. 8. En el examen directo y en el cultivo de biopsia no se obtuvo respuesta, pero en el cultivo del líquido pleural se encontraron 7 metafases una de las cuales presentó gaps y 3 se encontraron en prometafase.

Paciente No. 9. En el examen directo y en el cultivo de biopsia no se obtuvo respuesta. En el cultivo del líquido pleural se encontraron 7 metafases de las cuales 3 solamente fueron evaluables presentando un cariotipo 46, XX.

Paciente No. 10 y 11. Sólo se recibió muestra de biopsia y tanto en el directo como en el cultivo no hubo respuesta.

Paciente No. 12. Sólo se realizó el examen del líquido pleural en el cual no hubo respuesta.

**ESTUDIO CITOGENETICO
BIOPSIA PULMONAR**

CUADRO # 7

PACIENTE	REALIZADO	RESPUESTA	# MITOSIS	HALLAZGOS
1	SI	SI CULTIVO	5	MITOSIS NO VALORABLES
2	SI	SI DIRECTO	1	HIPERDIPLOIDIA
3	SI	SI DIRECTO	8	HIPERDIPLOIDIA, DOBLES MINUTAS, MARCADORES, ROMPIMIENTOS CROMOSOMICOS
4	SI	NO	-	-
5	SI	NO	-	-
6	SI	SI DIRECTO	3	46, XX
7	SI	NO	-	-
8	SI	NO	-	-
9	SI	NO	-	-
10	SI	NO	-	-
11	SI	NO	-	-
12	NO	-	-	-

**ESTUDIO CITOGENETICO
LIQUIDO PLEURAL**

CUADRO # 8

PACIENTE	REALIZADO	RESPUESTA	# MITOSIS	HALLAZGOS
1	NO	-	-	-
2	NO	-	-	-
3	NO	-	-	-
4	NO	-	-	-
5	NO	-	-	-
6	SI	SI CULTIVO	22	ROMPIMIENTOS CROMATIDICOS, GAPS
7	SI	NO	-	-
8	SI	SI DIRECTO	7	GAPS, MITOSIS EN PROMETAFASE 42%
9	SI	SI CULTIVO	7	3 MITOSIS EVALUABLES 46, XX
10	NO	-	-	-
11	NO	-	-	-
12	SI	NO	-	-

Estos análisis fueron realizados a través de la técnica de tinción homogénea. Debido a las condiciones del material no se obtuvieron bandas G ni bandas Q de calidad para un diagnóstico confiable. A excepción del paciente No 9 el cual fue diagnosticado a través de la técnica de bandas Q.

Las fotografías muestran ejemplos de las metafases encontradas. Las fotografías 1 y 2 muestran ejemplos de las metafases encontradas en el examen directo de la biopsia y la fotografía 3 del cultivo de líquido pleural.

El diagnóstico citológico de todos los pacientes a los cuales se les realizó el estudio citogenético de líquido pleural (6, 7, 8, 9, 12) fue positivo a malignidad con diagnóstico de Adenocarcinoma.

4.1.8 CORRELACION DE LOS DATOS CLINICOS CON LOS HALLAZGOS CITOGENETICOS.

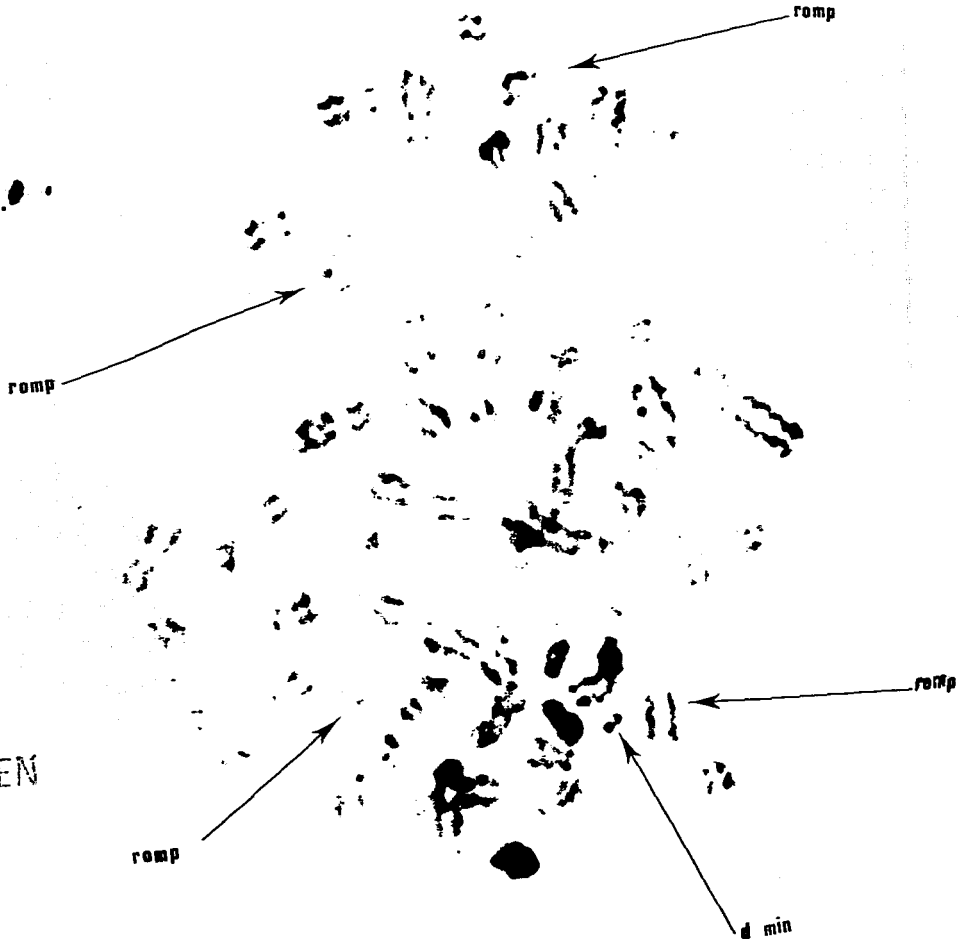
Los pacientes 8 y 9 quienes tuvieron la mayor pérdida (14 y 39 Kg) en menos tiempo fueron los que no respondieron al tratamiento citogenético en la biopsia pulmonar, el líquido pleural de estos mismos pacientes se encontró: en el paciente 8, gaps y mitosis en prometáfase, mientras que en el paciente 9 presentó sólo tres mitosis evaluables de mala calidad (típico de las células tumorales).

En todos los casos estudiados se encontraron células malignas en el líquido pleural, a través del estudio citológico. El paciente 6, tuvo una pérdida de 20 kgs, presentó rompimientos cromatídicos y gaps.

En el estudio citogenético del paciente 3, se encontraron hiperdiploidías, dobles minutas, cromosomas marcadores y rompimientos cromosómicos, este paciente tuvo una pérdida de peso de 10 kgs.

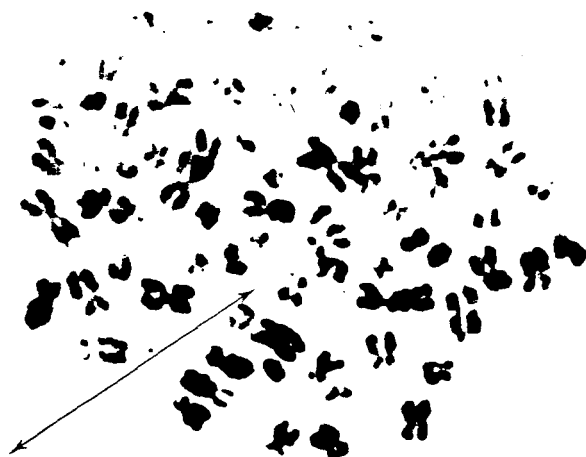
FOTOGRAFIA # 1
EXAMEN DIRECTO DE LA BIOPSIA

55



FALLA DE ORIGEN

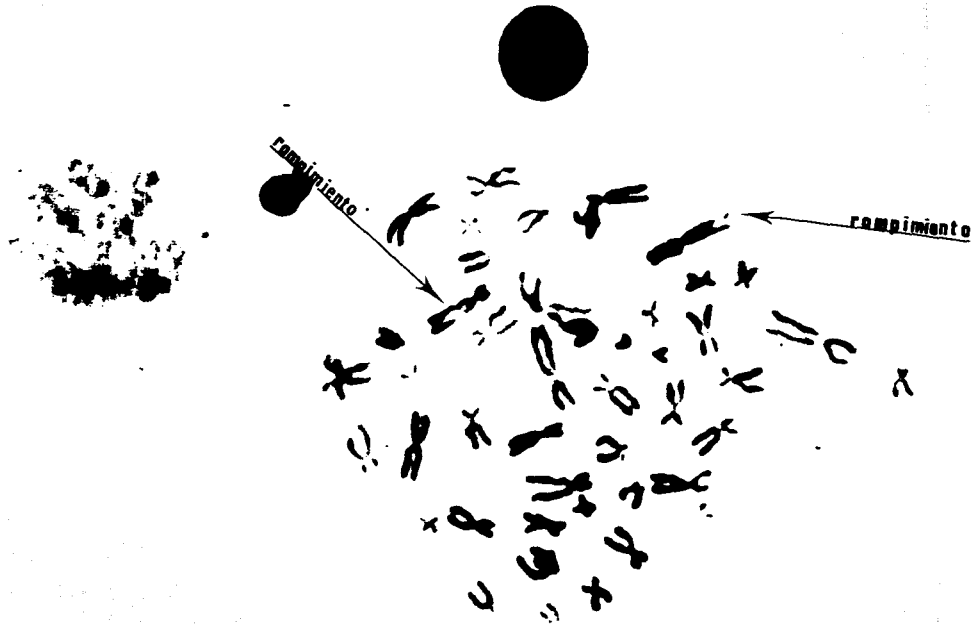
FOTOGRAFIA # 2
EXAMEN DIRECTO DE LA BIOPSIA



doble minuta

FALLA DE ORIGEN

FOTOGRAFIA # 3
CULTIVO CELULAR DE LIQUIDO PLEURAL



FALLA DE ORIGEN

4.2 DISCUSION

4.2.1 DATOS DEMOGRAFICOS

Las estadísticas existentes, reportan que esta enfermedad no tiene predilección por algún sexo ni edad específica, pero menciona un intervalo de edades entre los 35 y los 70 años de edad, lo cual coincide con lo encontrado en esta pequeña serie. (22, 27, 34).

4.2.2 PROBABLES FACTORES PREDISPONENTES

En cuanto a factores predisponentes, los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados en otras series hechas en México; aunque difieren un poco con lo reportado en series realizadas en países desarrollados. Esto nos habla además de una probable relación con otros factores como son: genéticos, de dieta y de contaminación ambiental (serio problema en México). (10, 20, 23, 34). En el presente trabajo se encontró un alto porcentaje (58.33%) expuesto a humo de leña siendo este un dato relevante.

4.2.3 HISTOPATOLOGIA

Un dato importante que se puede relacionar con los resultados obtenidos en el estudio citogenético es el grado de diferenciación del tumor (de poco a moderadamente diferenciado); ya que este pudo haber influido en la baja respuesta al cultivo celular, al tratamiento con colchicina y al bajo índice mitótico encontrado. Por ejemplo el paciente No. 12 venía en muy mal estado general y sólo se le pudo hacer el diagnóstico mediante la citología de líquido pleural y en el estudio citogenético no se encontró respuesta (es decir, no hubo células en metafase que pudieran ser analizadas).

A estos pacientes sólo se les pudo ofrecer un tratamiento paliativo, debido al estadio avanzado de la enfermedad (11, 13, 31).

4.2.4 SINTOMAS, SIGNOS Y DURACION DEL CUADRO CLINICO

Como dato importante se puede mencionar que la mayoría de los pacientes presentaron tos con expectoración, disnea, dolor torácico y pérdida de peso (23, 27, 34).

Existe divergencia en la literatura en cuanto a la pérdida de peso, ya que unos autores la asocian a la disminución de la supervivencia, mientras que otros mencionan que es una variable dependiente de otra, como es el estado general del paciente (10). En este trabajo se observó una importante relación de la pérdida de peso con la sobrevida de los pacientes.

4.2.5 RESULTADOS DE LABORATORIO

Es necesario tomar en cuenta los resultados de laboratorio, tanto antes de la biopsia, como durante todo el seguimiento de la enfermedad, ya que aunque la LDH y la AST no son marcadores séricos específicos para el cáncer de pulmón, son un dato importante en la valoración de la presencia del tumor y de las posibles metástasis (en esta serie se encontró elevada la LDH en 6 de 7 pacientes). En los casos donde se aplica algún tratamiento, es necesaria la biometría hemática, ya que habla de la condición general de la médula ósea.

4.2.6 ESTUDIO CITOQUIMICO DEL LIQUIDO PLEURAL

Al igual que los datos de laboratorio, es de gran ayuda el estudio citoquímico del líquido pleural ya que, además de decir si se trata de un exudado o trasudado; se puede relacionar con el tipo de células obtenidas y los hallazgos encontrados en el estudio citogenético (tanto en el examen directo como en el cultivo). Algunos autores mencionan la ayuda del estudio citogenético del líquido pleural para determinar si la etiología del líquido pleural es debida a malignidad, tomando en cuenta la presencia de cromosomas marcadores, dobles minutos, rompimientos cromosómicos y cromatídicos, gaps, etc. (29).

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4.2.7 ESTUDIO CITOGENETICO

Existen muy pocos reportes citogenéticos de cáncer de pulmón de células no pequeñas; estos reportan alteraciones numéricas y estructurales no específicas. Dichos estudios concuerdan con los hallazgos encontrados en el presente trabajo. Las dobles minutas, los rompimientos cromosómicos y cromatídicos, los gaps, los cromosomas marcadores y las hiperdiploidías son alteraciones características de las células tumorales las cuales fueron encontradas en esta serie (14, 29, 30, 32, 35).

4.2.8 CORRELACION DE LOS DATOS CLINICOS CON LOS HALLAZGOS CITOGENETICOS

Existen pocos reportes en donde se relacionan los datos clínicos de los pacientes con el estudio citogenético, tanto de la biopsia, como del líquido pleural. En esta serie una importante respuesta al estudio citogenético del líquido pleural (58,5%), presentando todos los pacientes células malignas, sugiriendo relación entre los hallazgos citogenéticos y la citología (29).

La pérdida de peso se encontró relacionada directamente con los hallazgos citogenéticos (22, 29).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.-Es difícil obtener material adecuado para el estudio citogenético (es decir que respondan a agentes antimitóticos) en biopsias y líquidos pleurales de pacientes con Adenocarcinoma pulmonar.
- 2.-No se encontraron alteraciones citogenéticas específicas en los Adenocarcinomas pulmonares estudiados.
- 3.-A pesar de que no se encontraron alteraciones citogenéticas específicas, se obtuvieron hiperdiploidias, dobles minutas, cromosomas marcadores, gaps, rompimientos cromosómicos y cromatídicos, mitosis en prometafase y anafase, típico de las células tumorales(7 pacientes de 12).
- 4.-Se obtuvo mejor material para el análisis citogenético, primero en el líquido pleural y después en el estudio directo de la biopsia y prácticamente material muy pobre en el cultivo de las biopsias.
- 5.-Se observó importante relación entre la pérdida de peso y la respuesta al estudio citogenético.
- 6.-Aunque la serie es pequeña, parece existir relación entre la exposición a humo de leña y el Adenocarcinoma pulmonar(7 de 12 pacientes).

BIBLIOGRAFIA

1. Albert B., MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, Ed. Garland Publishing Inc., Second Edition, 1202, 1214 -1215, New York 1989.
2. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, E. Karger, 38, 46 - 47, 66 - 70, Switzerland 1985.
3. Avers J. Charlotte, BIOLOGIA CELULAR, Ed. Iberoamericana, 416 - 417, México 1981.
4. Aberree A. S., Bridge A. J., Techniques in cancer cytogenetics: an overview and update, Cancer Investigation, 10(2): 163 - 172. 1992.
5. Carnoy D., Sikora K., GENES AND CANCER, Ed. Jon Wiley and sons, 303 - 311, USA 1990.
6. XXV Congreso Nacional de Neumología y Cirugía de Torax, Sociedad Mexicana de Neumología y Cirugía de Torax A.C., Ixtapa Zihuatanejo, México, Memorias trabajos libres, 1993.
7. De la Mora T., Aiello G. V., Departamento de archivo clínico y bioestadística del Instituto Nacional de Cancerología, México 1993.
8. Farnsworth M. W., GENETICS, Ed. Harper and Row, 98 - 119, 300 - 303, USA 1978.
9. Fishman P. Alfred, PULMONARY DISEASE AND DISORDERS, VOL. II, Ed. Mc.GRAW-Hill Co., Second edition, 2117 - 2138, 2159 - 2169, USA 1988.
10. González Baron M., Espinosa E., Zamora P., Factores pronósticos en el cáncer de pulmón, Revisiones en cáncer. Cáncer de pulmón I, 8 Num. 3 14 - 21, 1994.
11. Green S., Rivero S. O., Evolución y avances en el tratamiento quirúrgico del cáncer pulmonar excepto de células pequeñas, Neumología y cirugía de torax LII Num. 2 9 - 18, 1993.
12. Guidelines for Cancer Cytogenetics, suplement to an international system for human cytogenetics nomenclature, Ed Karger, 39 - 40, Switzerland 1991.
13. Haskell M. O., CANCER TREATMENT, Ed. W. B. Saunders Company, third edition, 165 - 188, Philadelphia 1990.

14. Heim S. Mitelman F., CANCER CYTOGENETICS, Ed. Alan R. Liss Inc., 3 - 9, 227 - 235, New York 1989.
15. King Strasinger Susan, LIQUIDOS CORPORALES Y ANALISIS DE ORINA, Ed. El manual Moderno, primera edición, 266 - 269, México 1991.
16. Lehringer L. A., BIOQUIMICA, Ed. Omega S. A., segunda edición, quinta reimpresión, 780 - 781, España 1982.
17. Mitelman, CATALOG OF CHROMOSOME ABERRATIONS IN CANCER, Ed. Alan R. Liss, third edition, New York 1988.
18. Morstyn G., Brown J., Novak U., Garder J., Garson M., Heterogeneous Cytogenetics abnormalities in small cell lung cancer cell lines, *Cancer Research* 47, 3322 - 3327. 1987.
19. Nora y Fraser, GENETICA MEDICA, PRINCIPIOS Y PRACTICA, Ed. La Prensa Médica Mexicana, 315 - 318, México 1980.
20. Nova B. A., Green L. S., Beltrán O. A., Correa G. A., Cáncer broncogénico experiencia de doce años en el INC, *Cancerología*, 34:(4), 667 - 672. 1988.
21. Nowel C. P., Biology of disease cancer, chromosomes and genes, *Laboratory Investigations*, 66 No. 4, 407 - 417, USA 1992.
22. Palombo H., Estape J., Historia natural del cáncer del pulmón, *Revisiones en cáncer cáncer del pulmón*, 8 No. 3, 7 - 13. 1994.
23. Postgraduate Course Lung Cancer; ACCP 58 th, Annual International Scientific Assembly, American College of Chest Physicians, Chicago Illinois, 1992.
24. Registro Nacional de Cáncer, México, 1994.
25. Riam Freshney, CULTURE OF ANIMAL CELL. MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Ed. Wiley - Liss, 55 - 143, USA 1994.
26. Robbins, Contran, PATOLOGIC BASIS OF DISEASE, Ed. Anders, Second Edition, 164 - 165.

27. Roth A. J., Ruck D. J., Weisburg H. I., THORACIC ONCOLOGY, Ed. WB Saunders Company, 6 - 12, 38 - 49, 79 - 81, 142 - 153, 220 - 226, Philadelphia 1989.
28. Salamanca F., CITOGENETICA HUMANA, Ed. Médica Panamericana, Primer edición, 27 - 28, 43 - 62, 235 - 340, 254 - 261, México, 1990.
29. Sandberg A. A., THE CHROMOSOME IN HUMAN CANCER AND LEUKEMIA, Ed. Elsevier, Second edition, 56 - 61, 96 - 98, 106 - 108, 764 - 765, 774 - 779, 881 - 886, New York 1990.
30. Sigfried M. J., Zhou J-Y, Kiler M. S., Testa R. J., Cytogenetics abnormalities in non-small cell Lung Carcinoma: Similarities of findings in conventional and feeder cell layer cultures, Genes, Chromosomes and Cancer, 6, 30 - 38, 1993.
31. Skeel T. R., HANDBOOK OF CANCER CHEMOTHERAPY, Ed. Little, Brown and Company, Third edition, 158 - 166, Boston 1991.
32. Sozzi Gabriella, Miozzo Monica, Tagliabua E., Picrotti M. And Giyeppe Bella Porta, Cytogenetics abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients, Cance Research 5, 400 - 404, 1991.
33. The Merck Index, An Encyclopedia of chemicals drugs and biologicals, Tenth edition, Published by Merck and Co. Inc., Rahway N. J., USA 1983.
34. Vicent T., Devita J. R., Helman S., CANCER PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY, Tomo I, Third edition, 81 - 97, 591 - 611, USA 1989.
35. Whang-Peng J., Kao-Shan C. S., Lee E. C., Bunn P. A., Carney D. N., Gazdar A. F., Minna J. D., Specific chromosomes defect associated with human small cell lung cancer, deletion 3p (14-23), Science, 215 (8), 181 - 182. 1982.

APENDICE

PREPARACION DE REACTIVOS.

a) Amortiguador de fosfatos (10x):

Cloruro de sodio 8.76 g/l

Cloruro de potasio 1.94 g/l.

Fosfato de sodio (monobásico) 11.03 g/l.

Fosfato de potasio (monobásico) 1.90 g/l.

Disolver las sales en agua destilada y aforar a un litro.

b) Solución isotónica al 0.9%:

Cloruro de sodio 9.0 g/l.

Disolver la sal en agua destilada y aforar a un litro.

c) Solución hipotónica al 0,075 M:

Cloruro de potasio 5.59 g/l.

Disolver la sal en agua destilada y aforar a un litro.

d) Amortiguador de fosfatos Sørensen:

Fosfato de potasio (monobásico) 6.663 g/l.

Fosfato de sodio (dibásico anhidro) 2.56 g/l.

pH 6.7

Disolver las sales en agua destilada y aforar a un litro.

e) Colchicina:

Solución madre:

Colchicina 0.01 g/10 ml de agua destilada.

Solución de trabajo: Tomar 1 ml de la solución madre y aforar a 100 ml con agua destilada para obtener una concentración final de 0.01 mg/ml.

f) Fitohemaglutinina:

Rehidratar con agua desionizada estéril según especificaciones del proveedor.

g) Solución de Tripsina (tinción bandas G):

Tripsina 0.03 g.

EDTA 0.02 g.

Amortiguador Sørensen 50 ml.

Disolver la Tripsina y el EDTA en la solución amortiguadora.

h) Solución de EDTA.

Cloruro de sodio 8.0 g/l.

Cloruro de potasio 0.4 g/l.

Dextrosa 1.0 g/l.

Bicarbonato de sodio 0.58 g/l.

EDTA 0.2 g/l.

p.H 7.3

Disolver las sales en agua destilada y aforar a un litro. Esterilizar por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ .

i) Solución Tripsina-EDTA:

Solución de EDTA 100 ml.

Tripsina 0.05 g.

Disolver la tripsina en la solución de EDTA y esterilizar por filtración con membrana millipore de 0.22 μ

j) Fijador de CARNOY:

Metanol 3 partes.

Ácido acético glacial 1 parte.

Mezclar por Inversión.

k) Solución de Wright:

Solución madre:

Colorante de Wright 0.8 g.

Metanol (absoluto) 480 ml.

Permitir la maduración del colorante durante 1 mes en frasco ámbar a temperatura ambiente.

l) Solución de GIEMSA:

Colorante de GIEMSA 1.0 g.

Glicerina 66 ml.

Metanol (absoluto) 66 ml.

Mezclar el colorante y la glicerina durante 5 hrs. en baño María a 40-45°C. Dejar enfriar, adicionar el metanol y mezclar con agitador magnético durante 24 hrs.

Permitir la maduración del colorante 1 mes en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución de trabajo: Tomar 5 ml de la solución madre y aforar a 50 ml con solución amortiguadora de Sörensen.

m) Solución de Quinacrina:

Quinacrina 0.005 g.

Sol. A 5 ml.

Sol. B 7 ml.

Agua destilada 108 ml.

n) Solución A:

Fosfato de potasio (monobásico) 56.7 g.

Agua destilada 1.25 l.

Disolver la sal en el agua destilada.

ñ) Solución B:

Fosfato de potasio (dibásico) 74.1 g.

Agua destilada 1.25 g.

Disolver la sal en agua destilada.

o) Medio de cultivo:

Medio de cultivo RPMI-1640 10.39 g/l.

Glucosa 2.5 g/l.

Bicarbonato de sodio 2.0 g/l.

pH 7.3

Disolverlos en agua destilada y aforar a un litro. Esterilizar por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ .

p) Suplemento de medio de cultivo:

Suero fetal bovino (inactivar a 56°C/30 min.) . 10%.

L-Glutamina 2 mM.

Piruvato de sodio 1 mM.

Añadir todos los suplementos al medio de cultivo bajo condiciones de esterilidad y mezclar por agitación.