



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA  
DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMOR  
APC EN CARCINOMA PULMONAR DE  
CÉLULAS GRANDES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
MANUEL MENESES FLORES



DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

2005



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN ESCOLAR

m. 344164



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**



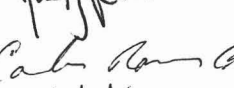

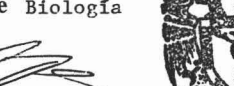
Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Localización Inmunoquímica de la Proteína Supresora de Tumor  
APC en Carcinoma Pulmonar de Células Grandes."

realizado por MANUEL MENESES FLORES


con número de cuenta 07717880-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director Propietario	DR. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ	
Propietario	DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ	
Propietario	DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCÍA	
Suplente	DR. CARLOS RAMOS ABRAHAM	
Suplente	BIOL. JOSÉ AQUILES BERNAL MORENO	

Consejo Departamental de Biología

  
M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DE LA UNIDAD DE  
INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS

Asesor: Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ \_\_\_\_\_

Sustentante: MANUEL MENESES FLORES \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

El sustentante, Manuel Meneses Flores desea presentar su agradecimiento a:

La Universidad Nacional Autónoma de México.

A los integrantes del jurado:

Dr. José Sulivan López González

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Carlos Ramos abraham

Biol. José Aquiles Bernal Moreno

Y a la Fundación Clara Luna Gutiérrez



Este trabajo está dedicado:

A mi esposa, Graciela Valdéz Luna

A mi Hija, Graciela Meneses Valdéz

Y a mis nietos: Diana Laura, Leonardo y Bernardo.

A mis amigos:

Juancarlos, Alejandra , Isaél,

A mis compañeros del Laboratorio de Cancer Pulmonar:

Federico, Dolores, Heriberto, Víctor, Patricia, Argelia Hector, y al Doctor Sullivan.

Y a las piedras, lagartijas y al sol del Pedregal.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL PULMÓN.....	2
CÁNCER PULMONAR.....	4
ETIOLOGÍA.....	4
CARCINOGENÉISIS.....	6
PATOLOGÍA.....	8
CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS.....	9
CARCINOMAS DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS.....	9
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	9
ADENOCARCINOMA.....	10
CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES.....	10
METÁSTASIS.....	11
UNIONES CELULARES.....	14
EL COMPLEJO DE ADHESIÓN CELULAR CADHERINA-CATENINA.....	18
CADHERINAS.....	18
LA FAMILIA DE LAS CATENINAS.....	19
LA PROTEÍNA APC SUPRESORA DE TUMOR.....	20
APC Y $\beta$ -CATENINA EN LA RUTA WNT.....	21
FACTORES QUE REGULAN EL COMPLEJO DE ADHESIÓN CADHERINA-CATENINA.....	24
LA FAMILIA DE PEQUEÑAS GTPasas.....	25
ANTECEDENTES.....	28
LA PROTEÍNA APC: DOMINIOS Y FUNCIONES.....	28
MECANISMOS DE INACTIVACIÓN DEL GEN APC.....	33
DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA APC.....	34
LOCALIZACIÓN DE APC EN TEJIDO SANO Y EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES.....	35
JUSTIFICACIÓN.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVO.....	37
TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
ANTICUERPOS.....	39
PROTOCOLO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS.....	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
RESULTADOS.....	46
EXPRESIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE LA MOLÉCULA APC EN LOS CARCINOMAS PULMONARES DE CÉLULAS GRANDES.....	46
INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE APC.....	47
LOCALIZACIÓN DE APC.....	48
DISCUSIÓN.....	53
TEJIDO PULMONAR NORMAL.....	53
TEJIDO PULMONAR MALIGNO.....	54

CONCLUSIONES.....	58
GLOSARIO.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	62

## RESUMEN.

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte en el ámbito mundial, contribuyendo con el 17.8% del total de la mortalidad originada por el cáncer. El carácter letal de esta enfermedad, se debe principalmente a la capacidad metastásica de las células tumorales. Las alteraciones en el complejo de adhesión celular Cadherina-catenina han sido relacionadas con la desdiferenciación celular, pérdida de adhesión, incremento en la motilidad, y metástasis celular. La  $\beta$ -catenina, una de las proteínas integrantes del complejo, además de su papel estructural, actúa como un cofactor de transcripción de diversos proto-oncogenes. La biodisponibilidad de la  $\beta$ -catenina, es regulada por la proteína supresora de tumor APC. Los estudios sobre APC, en cáncer de colon, revelan que la proteína se encuentra truncada o no se produce. En cáncer de pulmón, existen estudios de citogenética que revelan que el gen *APC* se encuentra frecuentemente afectado por metilación aberrante, mutaciones o pérdida de la heterocigocidad. Debido a que no existen estudios sobre la expresión de la proteína APC en tumores pulmonares, el objetivo de este trabajo fue determinar si en carcinomas pulmonares de células grandes, la proteína supresora de tumor APC se expresa completa, truncada o no se expresa. El estudio fue realizado en 25 pacientes empleando inmunohistoquímica y los resultados indican que la proteína se expresó completa en 24% de los casos, truncada en 36% de los mismos y no se expresó en el 40% restante. La distribución intracelular de la proteína APC, fue exclusivamente citoplásmica.

# INTRODUCCIÓN

## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL PULMÓN

El aparato respiratorio está compuesto de una serie de tubos con aproximadamente 23 ramificaciones de distinto calibre que terminan en los alvéolos. En este sistema de ramificaciones se pueden distinguir dos zonas con funciones diferentes: la zona conductora del aire y la zona de intercambio gaseoso (Levitzki, M., 1987). En esta arquitectura se encuentran, además, las inervaciones provenientes del sistema nervioso central relacionadas con el control de la respiración y una extensa red de capilares que permiten la difusión e intercambio gaseoso con el alvéolo (Ham, W.A., 1960).

La zona conductora del aire esta constituida por la nariz, la orofaringe, la nasofaringe, la laringe, traquea, bronquios, bronquiolos y bronquiolos terminales, mientras que la zona de transición y respiratoria esta constituida por los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares y sacos alveolares (Levitzki, M., 1987).

En las cavidades nasales se encuentran folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. La parte posterior del vestíbulo se encuentra recubierta por epitelio plano estratificado no queratinizado que posteriormente se transforma en un epitelio ciliado cilíndrico pseudoestratificado con células caliciformes. Este tipo de epitelio recubre a todo el sistema respiratorio, a excepción del tercio anterior de la nariz y los conductos y sacos alveolares, estos dos últimos de la zona respiratoria (Ham, W.A., 1960).

Las diferencias tisulares y estructurales entre la porción conductora y la porción respiratoria están íntimamente ligadas con su función. La zona conductora permite un sistema de filtrado y acondicionamiento del aire durante su tránsito desde la nariz al alvéolo, el cual consiste en limpiar al aire de partículas extrañas, humedecerlo y calentarlo o

enfriarlo para mantenerlo a la temperatura corporal. Las partículas con un tamaño mayor a 10 micrómetros son retenidas en el tracto respiratorio superior, las partículas con un diámetro menor (entre 2 y 10 micrómetros) se depositan generalmente en las paredes de la tráquea, bronquios y bronquiolos y sólo las partículas con tamaño menor a 2 micrómetros tienen la posibilidad de depositarse en los conductos alveolares y alvéolos.

Las partículas atrapadas en las paredes de la nariz, faringe, traquea, bronquios y bronquiolos, pueden ser expulsados mediante las corrientes de aire generadas por el reflejo tusígeno o por el estornudo, pero lo más común es que sean removidas por el movimiento constante y uniforme de los cilios de las células del epitelio que recubre estos conductos y que, junto con las células caliciformes, integran el escalador mucociliar. En este sistema, los cilios, cubiertos por una fina capa de moco secretado por las células caliciformes y glándulas, deslizan las partículas atrapadas en el moco hacia la faringe, donde pueden ser deglutidas o expulsadas por la expectoración.

Con respecto a la superficie alveolar, se encuentra formada por dos tipos de células epiteliales denominadas neumocitos tipo I y neumocitos tipo II. Las primeras son células escamosas planas y las segundas son células secretoras (Dormans, J.A.M.A., 1996; 1995).; ambos tipos celulares se encuentran sobre una membrana basal que, en parte, es común con la membrana basal del epitelio capilar y que se denomina intersticio. En este compartimiento se puede encontrar fibras elásticas, fibroblastos y leucocitos que migran del capilar al alvéolo (Ham, W.A., 1960).

La membrana alvéolo-capilar separa el aire de los alvéolos de la sangre en el interior de los capilares y en ella se lleva a cabo el intercambio gaseoso. La pared alvéolo-capilar es una delgada hoja de

tejido integrada por tres estratos claramente definidos: el epitelio alveolar, la matriz extracelular y el endotelio capilar. Además, las paredes alveolares están integradas por una red de capilares muy poco laxa y suelen presentar poros, conocidos como poros de Kohn (Weibel, R.E., 1973)

## CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar representa el 12.3% de todos los cánceres en el mundo y es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se estima que en el año 2000 surgieron 1.2 millones de casos nuevos y, que en el mismo año, esta enfermedad causó 1.1 millones de muertes en todo el mundo, lo cual representa el 17.8% de la mortalidad originada por el cáncer (Minna, J.D., *et al.*, 2002).

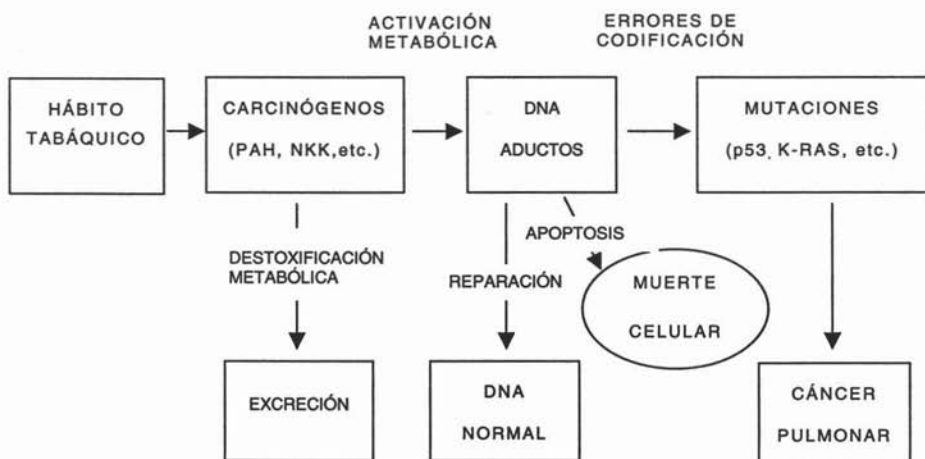
En la última mitad del siglo pasado, se incrementó el cáncer pulmonar en hombres y paulatinamente esta tendencia se ha evidenciado también en mujeres, principalmente asociado a la exposición al humo de tabaco. Actualmente un 25% de las defunciones por cáncer, en Norteamérica, se deben al cáncer pulmonar. A pesar de que la incidencia de cáncer pulmonar en mujeres es más baja que en hombres, esta enfermedad ha llegado a ser la segunda causa de muerte en mujeres.

La alta incidencia por cáncer pulmonar no muestra tendencia a disminuir o a estabilizarse, por lo que esta enfermedad sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública.

## ETIOLOGÍA

La causa exacta y patogénesis del cáncer pulmonar aún es desconocida; sin embargo, hay ciertos factores que han sido señalados como posibles agentes causales.

La epidemiología molecular ha puesto de manifiesto diferencias genéticas asociadas al riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. La mayoría de los agentes químicos naturales y hechos por el hombre son metabolizados por enzimas destoxicadoras, principalmente de la familia del citocromo P-450; sin embargo, algunas veces, estos compuestos son convertidos a productos con actividad citotóxica, mutagénica o carcinogénica. La presencia, en algunos individuos, de variantes génicas provoca que las proteínas sintetizadas presenten diferentes niveles de actividad, permitiendo que el tiempo de vida media de los carcinógenos se incremente y, con ésto, la posibilidad de unirse covalentemente a proteínas y ácidos nucleicos formando aductos e induciendo mutaciones, especialmente transversiones G-T, lo que conlleva a generar toxicidad celular (Minna, D.J., *et al.* 2002). La permanencia de las mutaciones inducidas por agentes genotóxicos marca la iniciación del proceso denominado carcinogénesis (ver Figura 1).



**Figura 1. Hábito tabáquico, carcinógenos y patogénesis del cáncer pulmonar.**



## CARCINOGENESIS

Actualmente se conoce un gran número de factores que actúan sobre el material genético y que han sido asociados con el desarrollo del cáncer, éstos se clasifican con base en su origen en, extrínsecos (factores físicos, químicos, biológicos) e intrínsecos (errores esporádicos durante la división celular, factores hormonales, hereditarios y epigenéticos).

Los defectos en el control de la duplicación y/o diferenciación celular originados por los factores intrínsecos o por la acción sinérgica de éstos con los factores extrínsecos origina dos tipos de eventos: el primero es la activación permanente de genes que codifican proteínas que inducen a la célula a dividirse, llamados proto-oncogenes. La activación de estos genes mediante procesos de amplificación, translocación o mutación puntual, da origen a los oncogenes. El segundo evento es la inactivación física o funcional por delección, mutación o modificación en su transcripción, de los genes supresores del crecimiento celular, denominados genes supresores de tumor (Webster, C.K. & White, L.R., 1995).

La acumulación de estas alteraciones en la célula es gradual y requiere un largo periodo de tiempo en el que pueden distinguirse diferentes etapas que conducen a la célula a ganar autonomía y, finalmente, al desarrollo de un tumor. Este proceso llamado carcinogénesis comprende las etapas denominadas: iniciación, promoción y progresión (DeVita, T.V., 1989).

Se considera que la etapa de iniciación es el resultado de la acción espontánea de cualquier agente genotóxico sobre los proto-oncogenes y/o genes supresores de tumor en cualquier célula del organismo (Minna, J.D., 2002). Esta alteración latente requiere ser permanente (irreversible) en la célula iniciada, lo que se logra porque

este mismo agente u otros actúan favoreciendo que las células entren a la fase de síntesis de DNA del ciclo celular.

La etapa de promoción puede ser bloqueada por agentes llamados anticarcinógenos, razón por la cual, la promoción puede ser considerada como un estado reversible del desarrollo neoplásico. Esta etapa es la que mejor se ha estudiado, ya que se manifiesta en un periodo de tiempo relativamente largo (DeVita, T.V., 1989).

Se ha demostrado en modelos experimentales, *in vivo* e *in vitro*, que la carcinogénesis involucra varios cambios progresivos (Greemberg, K.A., *et al.*, 2002) llamados:

- 1) Hiperplasia, que es la proliferación celular excesiva sin alteraciones cromosómicas ni cambios citológicos.
- 2) Metaplasia que implica la exacerbación de un tipo celular determinado, lo que origina un cambio en el tejido sano por otro distinto al que se produce normalmente (como lo que ocurre frecuentemente al momento de regenerar un tejido),
- 3) Displasia, que es un estado de degeneración celular debido a la pérdida de caracteres morfológicos y al incremento de anormalidades cromosómicas en las células iniciadas, frecuentemente consideradas como lesiones preneoplásicas.
- 4) Anaplasia, que es la regresión de las células a una forma muy primitiva e indiferenciada, conocida también como atrofia regresiva o desdiferenciación; este proceso comprende alteraciones en el número y estructura de uno o más cromosomas, así como la pérdida parcial o total de los caracteres morfológicos celulares en forma irreversible, por lo que se considera como el inicio del establecimiento de una neoplasia o tumor *in situ*.

Se estima que la célula transformada y en constante división, requiere de un periodo relativamente largo (años) para llegar a alcanzar una masa celular clínicamente detectable llamada tumor (Greemberg, K.A., *et al.*, 2002).

Algunos tumores pueden alcanzar la última etapa de su desarrollo natural llamada progresión, y que contribuye a la adquisición del fenotipo maligno. Este proceso es bastante dinámico y complejo, ya que está sujeto a una infinidad de factores provenientes tanto de la misma célula neoplásica como del hospedero.

#### PATOLOGÍA

El cáncer pulmonar es broncogénico a excepción de un pequeño porcentaje de casos; es decir, se origina de la mucosa bronquial. Cerca de la mitad de los tumores pulmonares son de localización central, ya que su origen es en las vías aéreas centrales; la otra mitad son periféricos, originándose en las vías aéreas pequeñas, sin embargo, es difícil hacer esta distinción en estadios avanzados (Farzan, S., 1985).

Aún cuando hay diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar, es común hacer referencia a los cuatro tipos principales de carcinomas. Estos tipos histológicos muestran características patológicas distintivas, así como diferencias epidemiológicas, clínicas, radiográficas y pronósticas particulares (Hollguins, N., 2001). Con base en estos aspectos, los carcinomas de pulmón se clasifican en dos grandes grupos: carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células no pequeñas.

## CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS

El carcinoma de células pequeñas representa aproximadamente el 18% de todos los tipos histológicos de carcinomas observados en pulmón (Hollguins, N., 2001). Tiene características neuroendócrinas y se ha propuesto que se origina de células programadas para diferenciarse en ese sentido (Minna, J.D., *et al.*, 2002).

Las células tumorales generalmente son pequeñas, redondeadas u ovals, con poco o nada de citoplasma semejantes a los linfocitos, aunque su volumen es casi del doble. El tumor crece en cúmulos que no muestran organización glandular ni escamosa; es el más agresivo de los tumores pulmonares y se caracteriza por su metástasis temprana y pobre pronóstico.

Muchos de estos tumores tienen una función endócrina consistente en la secreción de hormonas. Este carcinoma, al igual que el de células escamosas, está fuertemente relacionado con el tabaquismo activo y pasivo.

## CARCINOMAS DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS

Este grupo comprende los siguientes carcinomas:

### CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide, representa alrededor del 30% de todos los carcinomas pulmonares y es muy frecuente en individuos fumadores del género masculino (Hollguins, N., 2001). Patológicamente se caracteriza por la formación de puentes intercelulares, perlas de queratina y el desarrollo de islas grandes y bien definidas de células malignas. La mayor parte de estos carcinomas son de localización central y su metástasis es principalmente local, involucrando estructuras circundantes y nódulos linfáticos regionales. Dado que no hay epitelio escamoso en el pulmón, se considera que estos tumores se originan

de cambios metaplásicos provocados por el hábito de fumar (Minna, J.D., *et al.*, 2002).

#### ADENOCARCINOMA

Los adenocarcinomas representan cerca del 31% de todos los carcinomas pulmonares y, el carcinoma bronquioalveolar, subtipo de adenocarcinoma, representa del 2 al 10% de los tumores pulmonares primarios (Hollguins, N., 2001). Este tipo de tumor se origina de células progenitoras de bronquiolos (i.e., células de Clara) o alveolares (pneumocitos tipo 1) o de células productoras de mucina (Minna, J.D., *et al.*, 2002). Este tipo histológico es actualmente el más común y su frecuencia se incrementa rápidamente.

El adenocarcinoma tiene la misma incidencia que el carcinoma de células escamosas, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Los adenocarcinomas bien diferenciados generalmente son de localización periférica con arquitectura glandular y producción de mucina. Las principales variantes histológicas comprenden al adenocarcinoma ordinario, que se origina en bronquio, y el adenocarcinoma alveolar, que se origina en la pared alveolar o los bronquiolos terminales. La metástasis a órganos distantes es muy frecuente en estos tumores (Farzan, S., 1985).

#### CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES

Este tipo histológico de carcinoma constituye alrededor del 9% de todos los carcinomas pulmonares. Es un carcinoma pobremente diferenciado y su diagnóstico histológico es por exclusión de adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas o carcinoma de células pequeñas. Este tipo de tumor puede crecer extremadamente rápido hasta alcanzar un gran tamaño; su metástasis es temprana

principalmente al mediastino y al cerebro (Hollguins, N., 2001; Farzan, S., 1985).

En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO), el carcinoma de células grandes está considerado como una sola entidad. Algunos grupos han propuesto que este tumor puede ser una variante muy desdiferenciada de adenocarcinomas o carcinomas de células escamosas que no pueden reconocerse como tales.

Algunos de estos carcinomas contienen mucina intracelular (como los adenocarcinomas), otros un gran número de células multinucleadas (similares a los carcinomas de células gigantes); en cambio, otros presentan citoplasma claro (como los carcinoma de células claras) y algunos otros tienen aspecto histológico netamente fusiforme (de manera similar a los carcinomas de células fusiformes).

## METÁSTASIS

Clínicamente, la metástasis puede ser considerada como el resultado final de la historia natural del cáncer. Además, la capacidad metastásica es una propiedad exclusiva y característica de los tumores malignos.

Un tumor se origina por la transformación de una célula normal en otra que escapa de los mecanismos de control que tiene el hospedero sobre el crecimiento y la diferenciación celular. La célula transformada prolifera para formar un tumor, que puede ser benigno o maligno. Suele considerarse que un tumor es benigno cuando permanece con una estructura similar a la del tejido del cual deriva, si crece lentamente por simple expansión, permanece encapsulado por una capa de tejido conjuntivo y, por último, los núcleos de sus células se dividen con pocas anormalidades y con pocos cromosomas anormales (Nicolson, G.L., 1979).

El tumor maligno, por el contrario, es de estructura muy desigual a la del tejido de origen, crece rápidamente y no permanece encapsulado, muestra muchas divisiones celulares y cromosomas anormales y, por último, invade el tejido normal circundante, diseminando células que tienen la propiedad de colonizar nuevos tejidos.

Los rasgos distintivos entre el estado benigno y maligno, basados en la velocidad de crecimiento y en el grado de "anormalidad" no son absolutos; puede decirse que lo que define específicamente a un tumor maligno, o cáncer, es la capacidad de invadir el tejido circundante y colonizar sitios alejados de su centro de formación, es decir, su capacidad metastásica.

La metástasis comprende una serie de eventos que implican interacciones entre las células malignas del tumor original y las células normales del organismo. Las etapas secuenciales que concluyen en la colonización de un tumor metastásico son:

- 1) la separación de células individuales del tumor primario,
- 2) la invasión por estas células del tejido circundante,
- 3) su intravasación a la corriente sanguínea o linfática,
- 4) su depositación y extravasación en un lecho vascular distante y
- 5) la invasión y proliferación en el órgano blanco.

El ciclo puede repetirse y originar un tumor terciario, razón por la cual, la invasividad y metástasis son las propiedades más lesivas de las células malignas (Nicolson, G.L., 1979).

Como primer paso, las células malignas se extienden desde su localización original e invaden el tejido normal inmediato. Algunas células invasoras penetran en una cavidad del cuerpo (por ejemplo, la cavidad abdominal o torácica) o en el torrente sanguíneo, linfa o líquido espinal, independizándose del tumor primario. En los vasos sanguíneos o linfáticos, las células individuales o los grupos

celulares, denominados émbolos tumorales, pueden ser transportados hasta lugares muy alejados de su origen. Las células que sobreviven al transporte en el sistema linfático suelen detenerse en los ganglios; las que sobreviven al transporte por el torrente sanguíneo paran en las vénulas o capilares. Una vez asentadas, las células malignas pueden escapar del entorno hostil de la linfa o la sangre mediante la invasión del tejido adyacente. Por último, la nueva micrometástasis se vasculariza, y su nueva red de vasos sanguíneos aportará los nutrientes necesarios para la proliferación y formación de una masa tumoral mayor.

Durante el proceso metastásico, las células malignas deben resistir la destrucción por parte de los distintos mecanismos de defensa antitumoral del hospedero (Nicolson, G.L., 1979), de hecho se considera que sólo el 0.01% de las células sobreviven a este proceso (DeVita, T.V., 1989).

La mayoría de los casos con cáncer pulmonar que finalizan en autopsia muestran metástasis y alrededor de la mitad de los casos, al momento de diagnosticarse, presentan evidencias de metástasis.

Localmente, la metastasis pulmonar se disemina hacia la pleura, pared torácica y estructuras del mediastino; mientras que, los sitios más comunes para la metástasis distante son los ganglios linfáticos, hígado, hueso, cerebro y glándulas adrenales.

Una alta proporción de tumores malignos que se originan en cualquier otro sitio del organismo causan metástasis a pulmón, debido a su especial irrigación sanguínea y linfática. Por su función de filtros, los capilares pulmonares detienen a los émbolos tumorales de la circulación venosa. De igual forma, la obstrucción de los linfáticos pulmonares por una masa tumoral infiltrante es prácticamente inevitable debido a su vasta distribución y a su función como conductos de drenaje (Nicolson, G.L, 1979).



Un paso crítico para la sucesión del proceso metastásico es la pérdida de la adhesión intercelular; es decir, la disfunción de los sistemas con que una célula se concatena a otras células o al sustrato.

#### UNIONES CELULARES

En los organismos multicelulares, los tejidos deben estar separados uno de otro y protegidos contra el ambiente externo. Las hojas epiteliales y endoteliales consiguen esto mediante la provisión de bordes celulares que cubren las superficies externas e internas del cuerpo. Los complejos de adhesión existentes entre células adyacentes en estas hojas incluyen a las uniones con hendidura (gap junctions), uniones estrechas (tight junctions), también conocidas como *zonula ocludens* y las uniones adherentes (adherence junctions). Las uniones adherentes comprenden a los desmosomas en banda, desmosomas puntiformes y los hemidesmosomas (Staehein, L.A. & Hull, E.B., 1978).

#### UNIONES CON HENDIDURA

Las uniones con hendidura están constituidas por proteínas de membrana conocidas como conexinas, las cuales permiten el transporte pasivo de iones y pequeñas moléculas de bajo peso molecular entre una célula y otra. Una unidad hexamérica de conexinas, denominada conexón, se acopla con el correspondiente conexón en la célula contigua estableciendo continuidad citoplásmica entre ambas células. Lo anterior permite sincronizar las funciones metabólicas y electrotónicas de las células al interior de un tejido. La mayoría de las células normales, en los tejidos sólidos, tienen

uniones funcionales de este tipo como un mecanismo de comunicación celular (Trotsko, E.J. *et al.*, 1998).

A nivel ultraestructural, en las réplicas de criofractura, se observa en la región de unión, una distribución en forma de disco de partículas alineadas entre sí en una y otra de las membranas adyacentes; estas partículas parecen formar conductos o canalillos intercelulares, con función de puente, para salvar el espacio intercelular desde una célula a otra, permitiendo así el intercambio intercelular de moléculas hasta de 1 KDa por los canales de conexión que miden unos 20 angstroms (Å) de diámetro (Staehelin, L.A. & Hull, E.B. 1978).

#### UNIONES ESTRECHAS (tight junctions)

Las uniones estrechas crean una barrera regulada en la ruta paracelular y junto con las uniones adherentes forman una unidad funcional denominada complejo de unión apical. Se ha identificado un gran número de proteínas asociadas a tal complejo; sin embargo, su función está pobremente definida. La barrera intercelular está formada por hileras de proteínas transmembranales llamadas ocludinas (Mitic, L.L. & Anderson, M.J., 1998) y claudinas (Turksen, K. & Tammy-Claire, T., 2004; Schneeberger, E.E. & Lynch, D.R. 2004). Este tipo de unión intercelular está implicado en el establecimiento y manutención de la polaridad celular (Cerejido, M., *et al.* 1998), así como en la diferenciación de un medio interno químicamente diferente entre la parte apical y la basal del epitelio.

En la región correspondiente a una unión estrecha, la cara externa de la membrana plasmática de dos células epiteliales adyacentes parece fusionarse, formando una región de íntimo contacto que constituye un aro que ciñe a cada célula.

En imágenes de cortes ultramicrotómicos se observa claramente que las membranas se encuentran fusionadas en una serie de puntos. En

las réplicas de uniones estrechas realizadas por criofractura (Staehein, L.A. & Hull, E.B. 1978), estas uniones se caracterizan por una red de crestas en ambas membranas compuestas por dos filas de proteínas de membrana fuertemente unidas, a manera de una cremallera modificada, que mantiene tan próximas a las membranas que el espacio intercelular se encuentra obliterado, bloqueando físicamente el paso de moléculas a través del epitelio (Singer, J.S., 2004).

#### UNIONES ADHERENTES (adherence junctions)

Las uniones adherentes o desmosomas son un tipo de unión intercelular que, además de mantener adheridas a las células, las sincroniza para que funcionen como una sola unidad estructural. El componente principal en este tipo de uniones son las cadherinas clásicas (Wijnhoven, L.P.B., *et al.*, 2000) y las cadherinas desmosómicas; estas últimas se agrupan en dos familias principales que son: las desmocolinas y las desmogleinas.

Con base en los tipos de filamentos citoplásmicos con que estas cadherinas se asocian, las uniones que se forman se clasifican en tres tipos que son: a) desmosomas en banda, b) desmosomas puntiformes y c) hemidesmosomas.

#### DESMOSOMAS EN BANDA

Los desmosomas en banda forman una franja que une a las células epiteliales adyacentes en la región inferior, inmediata a la unión estrecha. En esta zona de unión, el espacio intercelular está lleno de un material filamentoso fino. Por otra parte, las superficies citoplásmicas de ambas membranas plasmáticas adyacentes se encuentran asociadas con dos grupos de filamentos: uno en forma de manojo a lo largo de la cara interna de la membrana y otro que se

origina de la unión, o en sus proximidades, y se extiende hacia el citoplasma con una configuración aplanada. Estos filamentos tienen 70 Å de diámetro y contienen actina.

#### DESMOSOMAS PUNTIFORMES

A diferencia de las uniones estrechas o los desmosomas en banda, el desmosoma puntiforme no forma franjas ni bandas, sino que constituye puntos de contacto en forma de botón a diferentes niveles entre las membranas de células adyacentes. En el interior del desmosoma puntiforme, las dos membranas celulares son estrictamente paralelas y están separadas por un espacio de aproximadamente 300 Å. El espacio está relleno de material filamentoso que, en cortes ultramicrotómicos, parece estar zanjado en su parte media por una línea densa llamada estrato central. En la superficie citoplásmica de cada membrana hay una placa en forma de disco, a estas placas se encuentran conectados unos filamentos de 100 Å de diámetro llamados tonofilamentos. Los haces de tonofilamentos se originan en la profundidad del citoplasma y forman un bucle al atravesar las placas de los desmosomas puntiformes, otros se extienden paralelamente a la membrana y prácticamente no varían su dirección a través de la placa. Hay filamentos más finos que surgen de las propias placas y se prolongan desde la célula hasta el espacio intercelular donde entran en conexión con el estrato central en una disposición alternada. Estos filamentos proporcionan acoplamiento mecánico directo entre las redes de tonofilamentos de células epiteliales adyacentes, creando así una trama estructural continua para la totalidad del epitelio.

#### HEMIDESMOSOMAS

Los hemidesmosomas o semidesmosomas, constituyen el tercer tipo de unión adherente en las células epiteliales. Sirven como sitios de

anclaje para los haces de tonofilamentos pero, a diferencia de los desmosomas en banda y puntiformes, no unen a una célula con su vecina, sino que unen la región basal de células individuales con la matriz subyacente de tejido conjuntivo.

#### EL COMPLEJO DE ADHESIÓN CELULAR CADHERINA-CATENINA

El complejo E-cadherina-catenina es importante en la adhesión intercelular, en la manutención de la arquitectura tisular y el fenotipo celular diferenciado. Las alteraciones en la expresión o función de las proteínas participantes en este complejo, o de sus reguladores, han sido frecuentemente relacionadas con la pérdida de adhesión intercelular, alteraciones morfológicas, e incremento en la motilidad celular. Estos aspectos se han observado durante la transformación celular y la progresión maligna.

El conocimiento de los mecanismos que afectan a los diferentes componentes protéicos que integran el complejo, así como su modulación, son piedra angular para la comprensión de los eventos asociados al desarrollo del cáncer (Wijnhoven, L. P. B., *et al.*, 2000).

#### CADHERINAS

Estas moléculas son glicoproteínas calcio-dependientes y están clasificadas en más de 10 tipos diferentes con base en su distribución tisular; entre estos tipos se encuentran: la cadherina-N (neuronal), cadherina-V (vascular) y la cadherina-E (epitelial) (Potter, E., *et al.*, 1999).

En particular, la cadherina-E, también llamada uvomorulina, es una proteína transmembranal de 120 kDa codificada por el gen CDH1, localizado en la banda cromosómica 16q22.1 (Pecina-Slaus N. 2003; Wijnhoven, L. P. B., 2000). La cadherina-E se encuentra localizada

en regiones de la membrana celular especializadas en la unión de tipo adherente, formando parte del complejo de adhesión celular cadherina-catenina (ver Figura 2).

En su estructura primaria se reconocen cinco dominios extracelulares, un dominio transmembranal y dos dominios citoplásmicos. El dominio extracelular contiene la secuencia HVA (Histidina, Valina, Alanina) la cual le permite unirse con el dominio extracelular de otra cadherina-E, presente en la superficie de la célula adyacente, formando así una unión homotípica y, a base de éstas, un zipper molecular que mantiene unidas a las membranas celulares. Los dominios intracelulares de la cadherina-E se unen con las proteínas citoplásmicas conocidas como cateninas, las cuales, concatenan a la cadherina-E con el citoesqueleto. (Potter, E., *et al.*, 1999; Beavon, I.R.G., 2000) (ver: Figura 2).

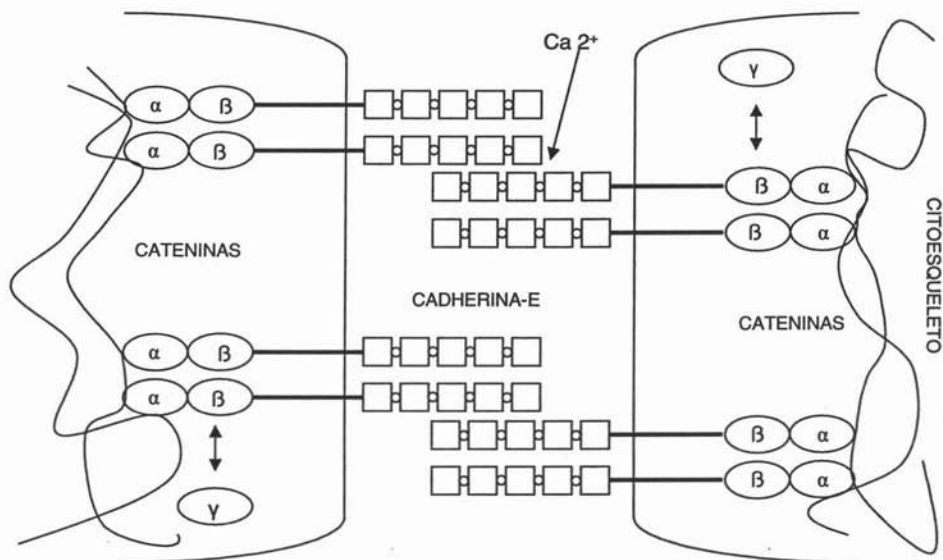
#### LA FAMILIA DE LAS CATENINAS

Esta familia está integrada por la  $\alpha$ -catenina (120 kDa, cromosoma 5q21-22 (McPherson, J.D., *et al.*, 1994),  $\beta$ -catenina (92 kDa, cromosoma 3p22), y  $\gamma$ -catenina (plakoglobina, 83 kDa, cromosoma 11q11) (Beavon, I.R.G., 2000). Las cateninas  $\beta$  y  $\gamma$  tienen un alto grado de homología; ambas se unen a la cadherina-E de manera mutuamente excluyente, posibilitando la coexistencia de por lo menos dos complejos cadherina-catenina independientes en la misma célula: uno conteniendo  $\beta$ -catenina y otro conteniendo  $\gamma$ -catenina (Potter, E., *et al.*, 1999). En cualquier caso, la catenina  $\alpha$ , es quien se encarga unir el complejo cadherina-catenina a la red de microfilamentos de actina del citoesqueleto (Beavon, I.R.G., 2000).

Además de su participación en el complejo de adhesión celular, la  $\beta$ -catenina desempeña un papel importante en la transducción de

señales, activación transcripcional, inhibición de la apoptosis, proliferación y migración celular (ver: Figura 2).

La proteína supresora de tumor APC (Adenomatous Polyposis Coli) tiene un papel particularmente importante en la regulación de la función de  $\beta$ -catenina (Fearnhead, N.S., 2001; Beavon, I.R.G., 2000).



**Figura 2. Complejo de adhesión Cadherina-E/ $\beta$ -catenina**

#### LA PROTEÍNA APC SUPRESORA DE TUMOR

La proteína APC es el producto del gen supresor de tumor APC (Adenomatous polyposis Coli). Este gen, localizado en el brazo cromosómico 5q21, consta de 8535 pares de bases espaciado por 21 exones. El gen codifica para la proteína de 2843 aminoácidos, en su forma silvestre, la cual contiene múltiples dominios. El exón 15 codifica más del 75% de la proteína y es blanco frecuente de

mutaciones somáticas y germinales (Kinzler, K.W., et.al. 1991; Groden, J., et al. 1991).

Las mutaciones germinales más frecuentes ocurren en los codones 1061 y 1309, mientras que las mutaciones somáticas ocurren con mayor frecuencia en los codones 1309 y 1450. Tanto las mutaciones somáticas como las germinales ocurren al interior de la región denominada "Región del Clóster de Mutación (RCM), comprendida entre los codones 1286 y 1513. Las mutaciones germinales ocurridas en esta región, especialmente aquellas cercanas al codón 1300, están asociadas con la pérdida de alelos (LOH), mientras que las aquellas mutaciones germinales ocurridas fuera de ella, tienden a inducir moléculas truncadas (Rowan, A.J., et al., 2000).

En la neoplasia de colon se ha reportado que las moléculas truncadas de APC, en las que se conserven los dominios de 15 aminoácidos reiterados, pueden unir a  $\beta$ -catenina (Rubinfeld, B., et al. 1993; Su, L.K., et al., 1993); sin embargo, sólo aquellas que conservan al menos 3 de los 7 dominios de 20 aminoácidos reiterados pueden ejercer su función supresora, consistente en la regulación de  $\beta$ -catenina (Munemitsu, S., et al 1995).

La acumulación de  $\beta$ -catenina libre, en el citoplasma, potencia su translocación nuclear incrementando su actividad transcripcional (Morin, J.P., et al., 1997).

#### APC Y $\beta$ -CATENINA EN LA RUTA WNT

Durante la embriogénesis, las células adquieren un nuevo comportamiento biológico conforme migran a nuevas localizaciones. Muchos de esos cambios morfogénicos son inducidos por ligandos extracelulares y sus receptores. Es probable que la desregulación de esas rutas origine alteraciones en la diferenciación, adhesión y



migración celular, procesos que tipifican a enfermedades como el cáncer (Nelson, J. W. & Nusse, R. 2004).

A pesar de que algunos factores de crecimiento son conocidos por afectar la expresión génica y migración celular, los enfoques más recientes se han centrado en la vía de señalización Wnt. Los ligandos Wnt son reguladores potentes de la proliferación y diferenciación celular. Sus rutas de señalamiento involucran a proteínas que participan directamente en la transcripción génica y en la adhesión celular. Un actor principal en la ruta Wnt, es la proteína  $\beta$ -catenina, la cual actúa como cofactor de transcripción con los factores TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor), además de participar como una proteína estructural adaptadora que concatena a las cadherinas con el citoesqueleto (Korinek, V., *et al.* 1997).

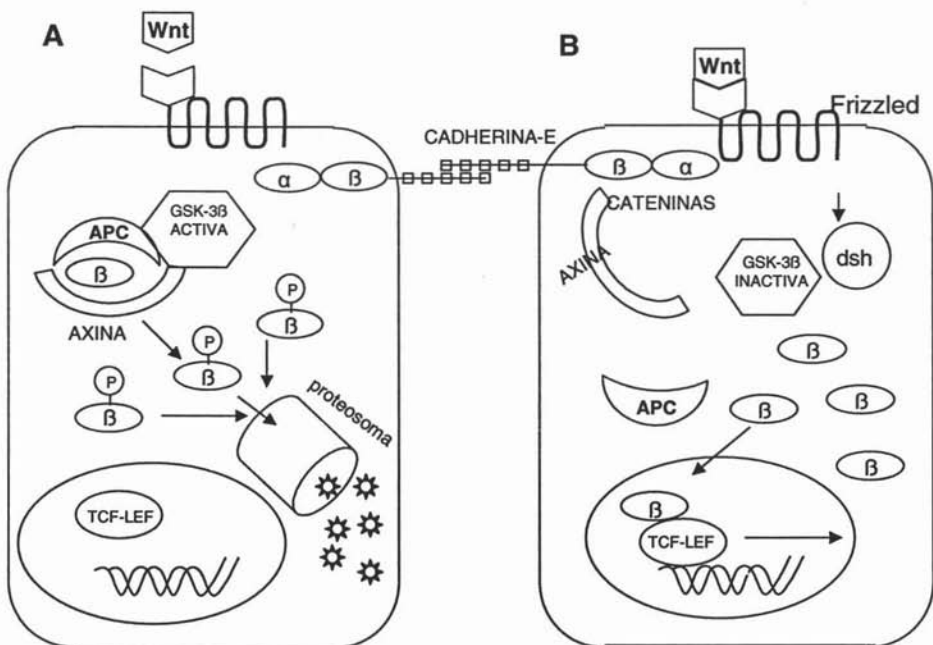
Convencionalmente, la señalización es iniciada mediante la unión de un ligando Wnt a dos tipos de moléculas receptoras: proteínas Frizzled y lipoproteínas relacionadas a receptor 5 y 6 (LRP-5/6) (Nelson, J.W. & Nusse, R. 2004) (ver: Figura 3).

La unión de Wnt a su receptor Frizzled conlleva a la activación de Disheveled (DVL) y a la inhibición de la actividad de la enzima glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), ocasionando la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma (Ciani, L., *et al.* 2003), lo que a su vez favorece su translocación al núcleo, para formar un complejo de transcripción con los factores TCF/LEF que induce la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular (ver: Figura 3B), por tanto, los eventos clave en la actividad señalizadora de  $\beta$ -catenina son su acumulación en el citoplasma y su translocación nuclear (Behrens, J., *et al.*, 1996).

En ausencia de la señal Wnt, el nivel de  $\beta$ -catenina citoplásmico es mantenido bajo mediante su degradación mediada por GSK-3 $\beta$  unida

a un complejo de andamiaje integrado por las proteínas axina y APC. Posteriormente, la  $\beta$ -catenina es marcada para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S (ver: Figura 3A).

Está bien documentado que los genes Wnt, junto con otros componentes de la ruta están implicados en el cáncer. Existe un consenso generalizado en que los blancos principales del complejo  $\beta$ -catenina/TCF son los genes que codifican para las proteínas c-Myc y Ciclina D1, ambas involucradas en la regulación de la proliferación celular, así como el gen para la matrilisina, la matrilisina (MMP-7), una enzima proteolítica de la matriz extracelular perteneciente a la familia de las metaloproteinasas (Zochbauer-muler, *et al.* 2002). Lo anterior explica, en parte, por qué la activación aberrante de la ruta Wnt ha sido observada en muchos cánceres, particularmente en cáncer de colon.



**FIGURA 3. Vías de señalización Wnt. A en ausencia de la señal Wnt. B en presencia de la señal Wnt.**

FIGURA 3.  $\alpha$  = catenina alfa;  $\beta$  = catenina beta; Wnt = señal de diferenciación y proliferación celular; GSK-3 $\beta$  = Enzima glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$

P = Fosfato; APC = Proteína Adenomatous pólipos coli; TCF/LEF = Factor de transcripción de células T/ factor Linfoide amplificador ; dsh = proteína Disheveled

#### FACTORES QUE REGULAN EL COMPLEJO DE ADHESIÓN CADHERINA-CATENINA.

##### Receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR)

El factor de crecimiento epidermoide (EGF) mediante su receptor (EGFR) participa en la regulación del sistema cadherina-catenina. EGFR es una familia de receptores tirosin cinasa que comprende cuatro miembros: ErB1, también llamado EGFR; ErB2, referido como c-Neu; ErB3 y ErB4. Un ligando específico para EGFR, además de EGF, es el factor transformante del crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ).

EGFR tiene actividad de tirosin kinasa, la cual es activada mediante la autofosforilación después de su unión al factor de crecimiento epidérmico (EGF). La activación del receptor resulta en la fosforilación de los residuos de tirosina de  $\beta$ -catenina y su translocación al citoplasma (Beavon, I.R.G. 2000). Mediante este mecanismo EGF induce la fosforilación de  $\beta$ - y  $\gamma$ -cateninas (Jones, J.G.L. & Veale, B.R. 2003), causando la desestabilización del complejo cadherina-catenina.

La sobreexpresión de EGFR ha sido observada en algunos cánceres y está asociada con la redistribución de cadherina-E. Esto ha sido

observado en cáncer de pulmón, páncreas, tiroides, estómago, esófago, colorrectal y de vejiga (Wijnhoven, L. P. B., *et al.* 2000).

#### LA FAMILIA DE PEQUEÑAS GTPasas

La familia de pequeñas GTPasas se integra de proteínas cuya función depende del tipo de nucleótido guanina que presenten. Hay dos subfamilias: Ras y Rho. La subfamilia Rho agrupa entre sus miembros a Rho, Rac1, Cdc42 y otras.

Cdc42 y Rac1 se encuentran en dos formas interconvertibles: la forma inactiva, unida a GDP, y la forma activa, unida a GTP. La conversión de la forma inactiva a la activa está regulada positivamente por el factor de intercambio de nucleótido (GEF) guanosin difosfato/guanosin trifosfato. La conversión de la forma activa a la inactiva está intermediada por la proteína activadora de GTPasa (GAP).

Cuando Cdc42 y Rac1 se encuentran en su forma activa, pueden interactuar con su ligando IQGAP1, evitando que este interactúe con la  $\beta$ -catenina del complejo de adhesión; de esta manera, el complejo se mantiene estable.

En su forma inactiva, Cdc42 y Rac1 no pueden unir a IQGAP1, permitiendo que este interactúe con  $\beta$ -catenina, disociándola del complejo de adhesión, con la concomitante pérdida de adhesión intercelular.

Recientemente se ha reportado que la expresión constitutiva de Rac1 dispara la redistribución intracelular de  $\beta$ -catenina, culminando en su acumulación nuclear y, además, estimula la actividad transcripcional TCF/LEF-dependiente, en líneas celulares donde  $\beta$ -catenina se encuentra estabilizada (i.e., aberrantemente acumulada), debido a mutaciones en APC o en la misma  $\beta$ -catenina (Esufali, S. & Bapat, B. 2004).

Cabe mencionar que Rac1 es una proteína citoplásmica y su localización nuclear ocurre mediante la secuencia señal localizada hacia el extremo carboxi-terminal en la región denominada polibásica (PBR). Esta región está implicada en la amplificación de la acumulación nuclear de complejos protéicos que contienen un dominio armadillo, por lo que se ha propuesto que Rac1 puede regular la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina (Esufali, S. & Bapat, B. 2004).

La desregulación de  $\beta$ -catenina debido a la pérdida de función de APC, o a mutaciones en los sitios de fosforilación en el extremo amino-terminal de la misma  $\beta$ -catenina, estabilizan a esta proteína propiciando su acumulación citoplásmica y translocación al núcleo, donde  $\beta$ -catenina tiene parte activa en la regulación transcripcional de genes potencialmente oncogénicos cuando son sobreexpresados en la célula diferenciada (Rubinfeld. B., *et al.* 1997).

EL gen cyclina D1 ha sido identificado como un blanco transcripcional del complejo  $\beta$ -catenina/TCF/LEF, además de *c-myc* y matrilisina. La translocación nuclear de  $\beta$ -catenina, también bloquea la transcripción del gen CDH1 (cadherina-E), razón por la cual se cree que la regulación de  $\beta$ -catenina, es un factor clave en la progresión tumoral (Wijnhoven, L. P. B., *et al.* 2000).

La pérdida de adhesión celular, mediada por cadherina-E caracteriza la transición de una lesión benigna a una lesión invasiva y metastásica. Existen evidencias de que la cadherina-E también desempeña funciones importantes en la ruta de traducción de señales Wnt, ya que ésta proteína puede regular la respuesta celular a señales extracelulares potencialmente inductoras de la proliferación, diferenciación, migración, y muerte celular programada (apoptosis) (Pecina-Slaus N. 2003). La disfuncionalidad de la cadherina-E en el complejo de adhesión, se ha visto asociada con la desdiferenciación,

invasión local, metástasis regional, y la reducción de la supervivencia de pacientes con cáncer pulmonar (Bremnes, M. R., *et al.* 2002).

La función de la cadherina-E puede ser anulada no sólo por mutaciones de  $\beta$ -catenina o de la misma cadherina-E, sino también por alteraciones genéticas o epigenéticas en la molécula de catenina o sus reguladores (Campbell, R.J., *et al.* 2002; Wijnhoven, L. P. B., *et al.* 2000).

Dado que el complejo de adhesión es considerado como un supresor de invasividad y metástasis en tumores sólidos, la alteración de uno o varios de sus componentes así como de las distintas moléculas que participan en la regulación del complejo de adhesión tienen una importancia básica en el comportamiento de las células epiteliales malignas (Wijnhoven, L.P.B., *et al.*, 2000).

## ANTECEDENTES

### LA PROTEÍNA APC: DOMINIOS Y FUNCIONES

La estructura primaria de la proteína APC comprende tres regiones: la región amino-terminal, la región central y la región carboxilo terminal. En la región amino terminal se encuentran el dominio de oligomerización (D.O.) y la región armadillo (D.A.). En la región central se localizan 3 dominios de 15 (D.15 aa. R.), 7 dominios de 20 aminoácidos reiterados (D.20 aa. R.) y tres dominios de unión a axina (\*). En la región carboxilo-terminal se encuentran un dominio básico (D.B.), un sitio de unión para la proteína End Binding 1 (D.U. EB1) y otro para la proteína Human Disk Large (D.U. HDLG) (Fearnhead, N.S., *et al.*2001) (ver: Figura 4).

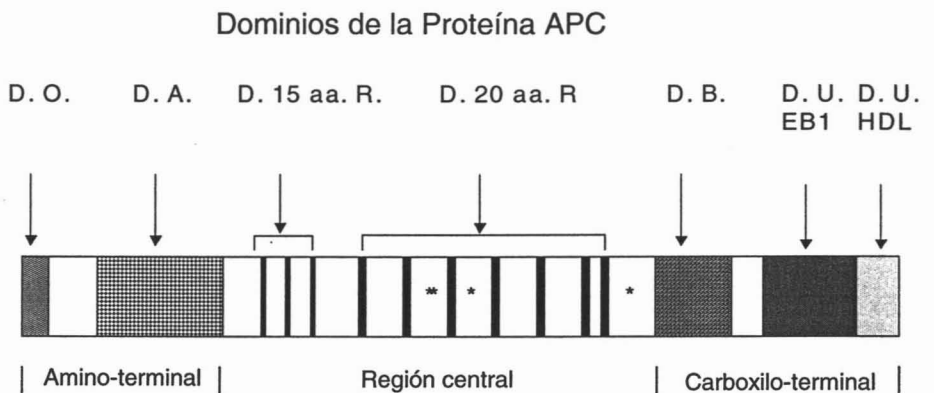


Figura 4. Representación de la molécula de APC

Mediante la interacción de sus múltiples dominios con otras proteínas, APC es parte integral de la ruta Wnt y desempeña un papel fundamental en los mecanismos de adhesión celular, estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y apoptosis (Fearnhead, N.S., 2001).

#### DOMINIO DE OLIGOMERIZACIÓN

El dominio de oligomerización abarca desde el aminoácido 6 al 57 del extremo amino-terminal. Las héptadas de aminoácidos, que ocurren al interior de este dominio, hacen posible que la forma silvestre de APC forme dímeros, tanto con otras formas silvestres como con proteínas truncadas de APC que pueden ocurrir en el tumor (Joslyn, G., 1993).

#### REGIÓN ARMADILLO.

La región armadillo comprende del aminoácido 453 al 767. Consiste de repeticiones de siete aminoácidos y muestra un alto grado de homología con un secuencia similar presente en las proteínas  $\beta$ -catenina en vertebrados y armadillo en *Drosophila*. Este dominio está altamente conservado e invariablemente es retenido en las formas mutantes de APC. Se ha demostrado que esta región se une a la subunidad regulatoria B56 de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), una enzima que también une axina mediante su subunidad catalítica. Este hecho sugiere que PP2A puede actuar como un antagonista de la cinasa glicógeno sintetasa  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), cuya función consiste en la fosforilación de  $\beta$ -catenina, marcándola así para su posterior degradación (Seeling, J.M., *et al.* 1999).

La región armadillo también se une al factor de intercambio del nucleótido guanina estimulado por APC (Asef), el cual actúa como un factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF) para las proteínas



Rac y Rho, lo que sugiere un papel alternativo para APC en la motilidad y estabilidad de los filamentos de actina en el citoesqueleto (Kawasaki, Y., *et al.* 2000; Barth, I.M.A. & Nelson, J.W. 2002)

#### DOMINIOS DE 15 AMINOÁCIDOS REITERADOS.

En la parte media de la proteína APC existen tres dominios de 15 aminoácidos reiterados, los cuales se localizan entre los aminoácidos 1020 al 1170. Estos dominios funcionan como sitios de unión para  $\beta$ -catenina; sin embargo, tal unión no induce la degradación de la  $\beta$ -catenina (Munemitsu, S., *et al.* 1995), a diferencia de lo que sucede cuando ésta proteína se une a una molécula de APC en la que se conservan los dominios de 20 aminoácidos reiterados (Tickenbrok. L., *et al.* 2003).

Los dominios de 15 aminoácidos reiterados se conservan en la mayoría de las formas truncadas de APC; ésto sustenta el hecho que, tanto la forma silvestre de APC, como las formas truncadas, pueden unir a  $\beta$ -catenina (Munemitsu, S., *et al.* 1995).

#### DOMINIOS DE 20 AMINOÁCIDOS REITERADOS.

En APC existen siete dominios de 20 aminoácidos reiterados que se encuentran entre los aminoácidos 1265 y 2035 de la región central de la proteína (Grodén, J., *et al.* 1991). Los fragmentos de APC que conservan estos dominios son capaces de unir  $\beta$ -catenina, lo cual ocurre solamente después de la fosforilación de cada uno de ellos por la enzima GSK-3 $\beta$  (Tickenbrok. L., *et al.* 2003).

Cuando la  $\beta$ -catenina se une a APC y a axina se forma un complejo que asocia a la GSK-3 $\beta$ , la cual promueve la fosforilación de los residuos de treonina y serina de  $\beta$ -catenina; de esta manera, la  $\beta$ -catenina es marcada para su proteólisis subsecuente mediada por

ubiquitina. Se ha demostrado que este proceso regulador de  $\beta$ -catenina es dependiente de la presencia de por lo menos tres de los siete dominios de 20 aminoácidos reiterados. Cabe observar que el extremo 3' de la región del cluster de mutación en el gen APC, se localiza en el codón 1513, lo cual coincide con el extremo 3' final del tercer dominio de 20 aminoácidos reiterados. La mayoría de las formas truncadas de APC carecen de todos, o casi todos estos dominios, lo cual sugiere que esta área en particular, es el blanco a eliminar durante la génesis o progresión tumoral (Fearnhead, N.S., *et al.*, 2001).

#### DOMINIOS DE UNIÓN A AXINA

APC contiene tres dominios de unión a axina; dos de ellos intercalados entre el tercero y cuarto dominio y entre el cuarto y quinto dominio de 20 aminoácidos reiterados. El tercer dominio se encuentra después del séptimo de estos dominios. Cada dominio de unión a axina contiene la secuencia característica SAMP (Serina, Alanina, Metionina, Prolina) que en caso de estar alterada no es capaz de unirse a axina. Esta última proteína posee, en su región central, sitios adyacentes de unión a GSK-3 $\beta$  y a  $\beta$ -catenina, así como un dominio Dix (Dishevelled axin) para homodimerización. Se ha postulado que la axina tiene una función de andamiaje en el complejo multiprotéico que forma con APC y  $\beta$ -catenina, lo cual facilita la fosforilación de estas proteínas por la enzima GSK-3 $\beta$  (Fearnhead, N.S., *et al.*, 2001).

#### DOMINIO BÁSICO

El dominio básico abarca del aminoácido 2200 al 2400 y se localiza en el extremo carboxilo-terminal de la proteína (Grodén, J., *et al.* 1991). Este dominio debe su nombre a la alta proporción de residuos de los aminoácidos básicos arginina y lisina, aunque también se

observa un alto predominio de prolina en esta región. Esta combinación sugiere que el dominio en cuestión es un sitio de unión a microtúbulos, teoría corroborada por la observación de que el extremo carboxilo-terminal de APC se une a microtúbulos y efectúa la polimerización de tubulina *in vitro*. Este dominio rara vez se conserva en las formas truncadas de APC (Fearnhead, N.S., *et al.*, 2001).

#### DOMINIO DE UNIÓN EB1

El dominio end binding protein (EB1) se extiende del aminoácido 2559 al 2771 de la región carboxilo-terminal de la proteína APC. Esta región, como lo indica su nombre es un sitio de unión para la proteína EB1. Esta proteína está relacionada con el centrómero, el huso mitótico y con los extremos más distales de microtúbulos en todos los estados del ciclo celular.

APC ha sido observado hacia los microtúbulos del citoesqueleto, específicamente hacia los extremos más distales de microtúbulos en crecimiento. Cuando el dominio EB1 es eliminado de la proteína APC, ésta aún puede unirse a microtúbulos por medio de su dominio básico; sin embargo, lo hace de manera indiscriminada. Lo anterior sugiere que EB1 dirige a APC hacia las puntas más distales de los microtúbulos, facilitando su interacción con sitios específicos de la membrana celular (Fearnhead, N.S., *et al.*, 2001).

#### DOMINIO DE UNIÓN HDLG

Finalmente, los 72 últimos aminoácidos (del 2771 al 2843) de APC conforman el dominio de unión a la proteína Human Discs Large (HDLG), la cual es homóloga de la proteína supresora de tumor "Discs Large" en *Drosophyla* (Matsumine, A., *et al.*, 1996). La asociación de APC con HDLG no ocurre cuando son deletados los 72 aminoácidos de la parte final de la proteína APC.

## MECANISMOS DE INACTIVACIÓN DEL GEN APC

Los estudios más recientes sobre la patogénesis del cáncer pulmonar, a nivel molecular, coinciden en que la pérdida de heterocigocidad (LOH) y la metilación aberrante son las causas más frecuentes de la inactivación de genes supresores de tumor (Zochbauer-muler, S., 2002). La región cromosómica 5q21 es frecuentemente afectada por pérdida de heterocigocidad, en este locus se localiza el gen supresor de tumor APC (Kinzler, K.W., *et al.*, 1991; Groden, J., *et al.* 1991).

En cáncer de colon, el gen APC es blanco frecuente de mutaciones somáticas y germinales (Nishisho, Y., *et al.*, 1991) que generalmente, se traducen en proteínas truncadas carentes de función supresora (Fearhead, N.S., 2001.; Morin, J.P., *et al.* 1997).

En cáncer de pulmón, los estudios citogenéticos realizados sobre APC revelan que en el grupo de carcinomas de células no pequeñas el gen se encuentra afectado por pérdida de heterocigocidad con una frecuencia que va del 30% al 80% (Fong, K.M., *et al.*, 1995; Hosoe, S., *et al.*, 1994; Shiseki, M., *et al.*, 1996), y en cáncer de células pequeñas la frecuencia varía de 70% a 80%, (Kawanishi, M., *et al.*, 1997; D'Amico, D. *et al.*, 1992).

Con relación a las mutaciones en el gen de APC, los reportes son contradictorios. No se han detectado mutaciones en el gen APC en carcinoma de células pequeñas (Horii, A. *et al.*, 1992) ni en carcinoma de células no pequeñas (Cooper, C.A., *et al.*, 1996; Furuuchi, K., *et al.*, 2000). En cambio, Ohgaqui y cols. (Ohgaqui, H., *et al.*, 2004) detectan mutaciones en la región del cluster de mutación (MCR) de APC en los carcinomas epidermoide y adenocarcinoma con una frecuencia relativamente baja (5%), comparado con lo reportado

en cáncer colorectal, donde el 83% de 41 líneas celulares derivadas de cáncer de colon presentan mutación y/o pérdida de heterocigocidad (Rowan, A.J., *et al.*, 2000).

Ya que en cáncer pulmonar, las mutaciones puntuales de APC son poco frecuentes, es posible que la participación de APC sea diferente a la que ocurre en el cáncer de colon.

Por otra parte, la metilación aberrante de la región promotora del gen APC ha sido observada en líneas celulares de carcinoma pulmonar de células pequeñas con una frecuencia de 26% y en tumores primarios de células no pequeñas con una frecuencia de 46% (Zochbauer-muler, S., 2002). La frecuencia de metilación en el carcinoma de células no pequeñas por subtipo histológico es de 72% en adenocarcinomas, 50% en carcinoma de células escamosas y 48% en carcinoma de células grandes (Virmani, A.K., *et al.*, 2001).

#### DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA APC

La función normal de las proteínas supresoras de tumor involucra la regulación de la respuesta celular a los estímulos de crecimiento, reparación del DNA y regulación del ciclo celular. Muchas de sus funciones están localizadas al interior de compartimentos celulares específicos; por tanto, la regulación de la localización subcelular de estas proteínas tiene un impacto sobre su función (Fabro, M. & Henderson, R. B. 2003). La localización subcelular de al menos diez diferentes proteínas supresoras de tumor, incluida APC, está regulada por sus secuencias de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES), las cuales le permiten un movimiento cíclico entre el núcleo y el citoplasma a través de la membrana nuclear (Fabro, M. & Henderson, R. B. 2003).

## LOCALIZACIÓN DE APC EN TEJIDO SANO Y EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

La proteína APC está expresada en una gran variedad de tejidos epiteliales. Su distribución frecuentemente coincide con localización de células en estado post-replicativo al interior de los tejidos. Los patrones de tinción demuestran que APC, si bien frecuentemente es difusa, su distribución es citoplásmica y puede acumularse en las regiones apicales y sub-apicales de la célula (Midgley, C.A. *et al.*, 1997). En colon, APC se localiza especialmente en las uniones intercelulares de tipo adherente de la región apical (Anderson, B.C., 2002), en la región basolateral y hacia el núcleo de las células epiteliales del cripto, observándose un gradiente de intensidad que crece de la base del cripto a la superficie luminal. (Smith, J. K., *et al.* 1993).

En el epitelio bronquial normal, las células ciliadas muestran una tinción notablemente fuerte a lo largo de su superficie apical, mientras que en el citoplasma, la tinción es difusa o finamente punteada con acentuación en los bordes marginales de la membrana plasmática (Midgley, C.A. *et al.*, 1997).

Por otra parte, el análisis de 40 líneas celulares derivadas de tumores esporádicos no colónicos, incluidas 9 líneas derivadas de pulmón (A427, Calu-1, Calu-6, A-549, A2182, SW1272, Hut292-Dm, 866MT y DMS92) revela que todas las líneas presentan la proteína APC completa con una distribución citoplásmica (Smith, J. K., *et al.* 1993).

De lo anterior queda claro que, salvo en algunas líneas celulares neoplásicas derivadas de pulmón, a la fecha no existen reportes sobre el *status* de la proteína APC en carcinomas pulmonares provenientes de pacientes, así como de su distribución subcelular.

## **JUSTIFICACIÓN**

El cáncer pulmonar representa el 12.3% de todos los cánceres y es la principal causa de muerte a nivel mundial. Dentro del grupo de carcinomas de células no pequeñas, el carcinoma de células grandes es la neoplasia más agresiva debido a su alta capacidad metastásica. Se ha demostrado que la pérdida de la adhesión celular es uno de los pasos críticos para la sucesión de la metastásis y que la proteína supresora de tumor APC desempeña un papel fundamental en los mecanismos de regulación de la adhesión y del ciclo celular.

En el carcinoma pulmonar de células no pequeñas, los estudios citogenéticos realizados sobre APC revelan que el gen se encuentra frecuentemente afectado por pérdida de heterocigocidad o por metilación aberrante y que las mutaciones de esta molécula son prácticamente inexistentes.

Los estudios anteriores se han realizado en líneas celulares, las cuales pueden reflejar sólo algunos de los eventos que conducen a la transformación maligna debido a la selección de una proporción celular durante su adaptación a las condiciones de cultivo. Por lo anterior, nos proponemos iniciar nuestro estudio empleando carcinomas pulmonares de células grandes con el objetivo de determinar si expresan o no la proteína APC; en caso de expresarla, determinar si la molécula APC se encuentra completa o truncada.

## HIPÓTESIS

Si en el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el gen APC se encuentra afectado por: mutación, pérdida de heterocigocidad o por metilación aberrante, entonces puede esperarse que en los carcinomas de células grandes, esta proteína se encuentre truncada o no se exprese.

## OBJETIVO

Determinar si la proteína supresora de tumor APC (Adenomatous Polyposis Coli) se expresa completa, truncada, o no se expresa en los carcinomas pulmonares de células grandes.



## TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación observacional, retrospectiva, transversal, analítica y a doble ciego.

El trabajo se realizó en el Departamento de Cáncer Pulmonar en colaboración con el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). El material biológico empleado fue cortes histológicos seriados, provenientes de biopsias y autopsias de pacientes con carcinoma pulmonar de células grandes. El tamaño de la muestra fue de 25 casos, en los cuales, el epitelio ciliado pseudoestratificado, localizado en zonas libres de neoplasia, fue utilizado como control.

Las variables bajo estudio fueron: la distribución, el nivel de intensidad y el patrón de tinción de la molécula APC en las células neoplásicas y en las células ciliadas, empleadas como control.

## DISEÑO EXPERIMENTAL.

Síntesis del proyecto:

El objetivo principal de este trabajo es la localización de la proteína supresora de tumor APC en cortes seriados de carcinoma pulmonar de células grandes; para lograr este objetivo, se decidió emplear la inmunohistoquímica. A fin de investigar si APC se expresa en forma completa o truncada, se emplearon anticuerpos específicos en contra de la porción amino o carboxilo-terminal de la molécula en estudio.

Puesto que las proteínas truncadas carecen del extremo carboxilo-terminal (Nishisho, Y., *et al.* 1991; Groden, J., *et al.* 1991), la reactividad de ambos anticuerpos se interpreta como indicio de que la molécula está completa; la no-reactividad del anticuerpo anti-carboxilo-terminal y la reactividad del anticuerpo anti-amino-terminal

indica que la molécula está incompleta; mientras que, la no-reactividad a ambos anticuerpos nos indicará la no expresión de APC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Se realizaron cortes histológicos provenientes de biopsias y autopsias de pacientes con carcinoma pulmonar de células grandes embebidas en parafina. Se realizaron cortes seriados con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  montados en portaobjetos de 2.5 X 10 cm. Se incluyó un total de 25 casos proporcionados por el Departamento de Patología del I.N.E.R.

Como control interno se empleó tejido pulmonar bronquial (epitelio ciliado pseudoestratificado) sin lesiones aparentes, presente en algunas de las mismas muestras biológicas; también se empleó tejido pulmonar sin alteraciones obtenido de pacientes con otras patologías pulmonares. En total se incluyeron 19 casos controles.

### **ANTICUERPOS**

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios policlonales: anticuerpo de conejo dirigido a la región amino-terminal del APC humano denominado APC H-290 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticuerpo de conejo dirigido a la región carboxilo-terminal del APC humano denominado APC C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Ambos anticuerpos fueron proporcionados a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo biotinilado hecho en cabra anti-conejo, obtenido de Dako Corporation, (Carpintería, CA). Como sistema amplificador se utilizó el complejo Estrepto-Avidina-Biotina-peroxidasa (StreptABCComplex) obtenido de Dako Corporation (Carpintería, CA). El sistema revelador contenía

indica que la molécula está incompleta; mientras que, la no-reactividad a ambos anticuerpos nos indicará la no expresión de APC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Se realizaron cortes histológicos provenientes de biopsias y autopsias de pacientes con carcinoma pulmonar de células grandes embebidas en parafina. Se realizaron cortes seriados con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  montados en portaobjetos de 2.5 X 10 cm. Se incluyó un total de 25 casos proporcionados por el Departamento de Patología del I.N.E.R.

Como control interno se empleó tejido pulmonar bronquial (epitelio ciliado pseudoestratificado) sin lesiones aparentes, presente en algunas de las mismas muestras biológicas; también se empleó tejido pulmonar sin alteraciones obtenido de pacientes con otras patologías pulmonares. En total se incluyeron 19 casos controles.

### **ANTICUERPOS**

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios policlonales: anticuerpo de conejo dirigido a la región amino-terminal del APC humano denominado APC H-290 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anticuerpo de conejo dirigido a la región carboxilo-terminal del APC humano denominado APC C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Ambos anticuerpos fueron proporcionados a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo biotinilado hecho en cabra anti-conejo, obtenido de Dako Corporation, (Carpinteria, CA). Como sistema amplificador se utilizó el complejo Estrepto-Avidina-Biotina-peroxidasa (StreptABCComplex) obtenido de Dako Corporation (Carpinteria, CA). El sistema revelador contenía

peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como sustrato y tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzidina como cromógeno.

## PROTOCOLO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

El protocolo consistió de los siguientes pasos:

### I RECUPERACIÓN DE ANTÍGENO

Después de desparafinar y rehidratar las secciones histológicas, las laminillas se colocaron en una jarra de Coplin conteniendo buffer de citratos (0.01M, pH=6). El desenmascaramiento de antígeno se realizó mediante incubaron a ebullición constante durante 15 min en un horno de microondas marca Sharp (Sharp carousel). Al finalizar la incubación se dejó enfriar durante 30 min hasta alcanzar la temperatura ambiente.

### II BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

Con la finalidad de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos fueron incubados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en alcohol metílico durante 30 min. La incubación se efectuó a temperatura ambiente y, al final de la misma, las secciones histológicas fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) durante 5 min en agitación constante.

### III BLOQUEO DE PEGADO INESPECÍFICO

Con la finalidad de evitar la unión inespecífica de los distintos anticuerpos empleados a los tejidos, estos fueron incubados previamente con una solución de PBS conteniendo suero de cerdo al 2% y Tritón X-100 al 0.5% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente.

Al final de la incubación, las laminillas fueron rotuladas para identificar su tratamiento. El área de tejido tratado fue delimitada, mediante el trazo circular con un lápiz hidrofóbico (Vector Laboratorios, Inc., Burlingame, CA).

#### IV INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO PRIMARIO

Las secciones de tejido fueron incubadas con 100  $\mu$ l de un anticuerpo que reacciona con los primeros 289 aminoácidos de la región amino de APC (anti-H 290) o con 100  $\mu$ l del anticuerpo que reacciona con la región carboxilo-terminal de APC (anti-C 20). Se emplearon diluciones 1:200 de cada anticuerpo y el periodo de incubación fue de dos horas en cámara húmeda a una temperatura de 32°C. Como controles se emplearon cortes histológicos en los que se omitió el anticuerpo primario. En cualquier caso, las laminillas fueron lavadas con una solución de PBS conteniendo Tween 20 al 0.1% (v/v) seguido de otro lavado con PBS. Los lavados se efectuaron durante 5 min en agitación constante.

#### V ANTICUERPO SECUNDARIO

Las secciones histológicas fueron incubadas con 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario biotinilado, previamente diluido 1:800, durante una hora en cámara húmeda a 32°C. Al final, las muestras fueron lavadas como se indicó anteriormente.

#### VI ADICION DEL COMPLEJO ABC

Las muestras fueron tratadas con 100  $\mu$ l del complejo estrepto-avidina-biotina-peroxidasa a una dilución 1:150 durante 30 min a 32°C en cámara húmeda. Al final de la incubación las muestras fueron lavadas como se indicó anteriormente.

## VII SISTEMA REVELADOR

Como sistema revelador se utilizó una solución de PBS conteniendo peróxido de hidrógeno al 30% y tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzidina (DAB) (0.4 µg/ml). Las muestras histológicas fueron incubadas durante 5 min con esta solución y al final la reacción fue interrumpida con agua corriente.

## VIII CONTRATINCIÓN

Las muestras fueron contrateñidas, con hematoxilina de Harris durante 3 min, deshidratadas empleando alcohol a varias graduaciones y finalmente las laminillas fueron montadas con resina sintética.

## CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos luego de la tinción inmunohistoquímica fueron evaluados por tres observadores independientes empleando un microscopio óptico marca Leica, modelo CME (Leica microsystems Inc., Buffalo New Cork, USA). De cada caso, se observaron por lo menos cinco campos a un aumento de 20X. Se evaluó la intensidad de la tinción así como la distribución y patrón de tinción de la molécula APC en células neoplásicas como en epitelio ciliado (sin ninguna alteración aparente) empleado como control.

## LOCALIZACIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE APC

La localización de los extremos terminales de APC con los anticuerpos correspondientes se clasificó en dos grupos mutuamente excluyentes: a) casos en los que hubo reacción al anticuerpo en

cuestión, y b) casos en los que no hubo reacción al mismo anticuerpo.

### **EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN**

La evaluación del nivel de intensidad se hizo utilizando una escala ordinal de cero a tres; el valor nulo (0) se asignó a los casos en los que no se observó tinción o fue similar a los controles que no se incubaron con el anticuerpo primario (background); el valor uno (+) a los casos en los que la reacción fue débil, dos (++) cuando la reacción fue moderada y tres (+++) para la reacción fuerte y franca.

### **DISTRIBUCIÓN DE LA MOLECULA APC**

La distribución de la molécula APC se clasificó como: nuclear, membranal o citoplasmática; a su vez, la distribución en el citoplasma se clasificó en: total, cuando se observó en todo el citoplasma, y parcial, cuando se observó de manera regionalizada.

### **PATRÓN DE LA TINCIÓN**

El patrón de tinción se clasificó como granular si presentaba una textura granular o difuso cuando no se observaron dichos gránulos.

### **DETECCIÓN DE LA MOLÉCULA APC COMPLETA O TRUNCADA**

Además, con base en la reactividad a los anticuerpos y, de acuerdo a la literatura existente, nuestros resultados obtenidos indican que la molécula APC se puede encontrar: a) completa, si se presenta

reactividad a ambos anticuerpos, b) truncada, cuando se observa reactividad sólo al anticuerpo que reacciona con el extremo amino-terminal de la molécula (anti-H 290) y c) no se expresa, cuando no se observa tinción con ninguno de los anticuerpos empleados.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables a comparar en este estudio son: reacción observada (+) vs. no observada (-); y el nivel de intensidad de reacción (mayor que la mediana combinada vs. menor que la mediana combinada).

La **hipótesis nula ( $H_0$ )** supone que la frecuencia del parámetro en evaluación es igual en el grupo control y el grupo cáncer; mientras que la **hipótesis alterna ( $H_1$ )** supone que la frecuencia del parámetro en evaluación es mayor en el grupo control respecto al grupo cáncer.

### Prueba estadística

Este estudio necesita una prueba para determinar la significancia de la diferencia observada entre dos muestras independientes. Debido a que las medidas son dicotómicas, la escala de medición es ordinal y el tamaño de la muestra ( $n$ ) es pequeño, se seleccionó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher (Siegel, S., 1970) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$

### Distribución muestral

La probabilidad de ocurrencia conforme a  $H_0$  de un conjunto observado de valores en una tabla de 2 X 2 se determina aplicando la fórmula:



$$p = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!}$$

donde  $p$  es la probabilidad exacta de obtener una distribución conforme  $H_0$  y, en el numerador se tiene el producto del factorial de los totales marginales, y en el denominador el producto del factorial del número de casos por el factorial de cada una de las frecuencias observadas en cada uno de los cuadrantes de una tabla de  $2 \times 2$ .

#### Región de rechazo

$H_1$  predice la dirección de las diferencias, por lo que la región de rechazo es de una cola.  $H_0$  será rechazada si los valores observados difieren en la dirección predicha y si la magnitud es tal que la probabilidad asociada con su ocurrencia, conforme a  $H_0$ , es igual o menor que  $\alpha=0.05$

#### Regla de decisión

Si la probabilidad determinada, es menor a 0.05, se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$ . En caso contrario, se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$ .

## RESULTADOS

La identificación de la molécula APC se llevó a cabo empleando los siguientes anticuerpos: El anti-H 290 que reconoce el extremo amino-terminal y el anti-C 20 que está dirigido contra la porción carboxilo-terminal. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

### EXPRESIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE LA MOLÉCULA APC EN LOS CARCINOMAS PULMONARES DE CÉLULAS GRANDES

Al comparar la reactividad de los anticuerpos empleados en los grupos en estudio se observó que todos los casos del grupo control se tiñeron con el anticuerpo anti-H 290; mientras que, en el grupo de cáncer sólo 15 (60%) de los 25 casos fueron positivos para este anticuerpo (ver: Tabla 1). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ).

Con el anticuerpo anti-C 20, en todos los casos del grupo control se observó reacción; mientras que en el grupo patológico, sólo en 6 (24%) de los 25 casos se observó reacción (ver: Tabla 1). La comparación estadística de estos resultados alcanzó una  $p=1.26 \times 10^{-7}$

Con relación al anticuerpo anti-C 20, en el grupo control, la reacción fue observada en todos los casos, donde previamente se observó reacción con el anticuerpo anti-H 290; mientras que en el grupo cáncer, el número de casos positivos para el anticuerpo anti-C 20 fue menor que el número de casos teñidos con el anticuerpo anti-H 290; sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística ( $p=0.091$ ) (Ver: Tabla 1).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que debido a que todos los casos del grupo control se tiñeron con ambos anticuerpos, las células epiteliales ciliadas expresan la molécula APC completa. En el grupo de los carcinomas, el 24% de los casos expresó la molécula APC completa, el 36% reaccionó sólo con el anticuerpo

dirigido contra la región amino-terminal y el 40% de los casos no fue teñido por los anticuerpos empleados. En ninguno de los casos de los grupos estudiados (control y patológico) se presentó tinción sólo al anticuerpo anti-C 20. Los resultados obtenidos en el grupo de carcinoma de células grandes se observan en la Tabla 2. Los resultados anteriores nos permiten concluir que el 24% de los casos del grupo cáncer presentaron una APC completa que podría ser funcional, mientras que el 76% de los casos presentan una molécula de APC alterada.

#### INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE APC

Los resultados obtenidos de la evaluación de la intensidad de la reacción observada con cada uno de los anticuerpos en los grupos estudiados se expresa en la Tabla 3. En el grupo control, el grado de intensidad de la reacción con el anticuerpo anti-H 290 fue alto en el 58% de los casos y medio en el 42% restante. En el grupo cáncer, el 20% de los casos presentó un nivel de intensidad alto; el 24%; presentó un nivel medio y en el 16% fue bajo, mientras que en el 40 % restante no se observó reactividad a este anticuerpo.

El nivel de intensidad de reacción al anticuerpo C-20 en el grupo control fue alto en el 63% de los casos y medio en el 37% restante; mientras que en el grupo cáncer, los niveles de intensidad medio y bajo se observaron con una frecuencia del 12% en cada uno; en el 76% de los casos restantes no se observó reactividad a este anticuerpo.

Con la finalidad de determinar si existe o no diferencia estadística en las distribución de casos de acuerdo a la intensidad mostrada en la Tabla 3 se empleó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, de acuerdo al protocolo descrito en la sección de métodos.

En la Tabla 4 se muestra la medida de tendencia central (mediana) empleada para resumir los datos expresados en la Tabla 3, esto es, la mediana del nivel de intensidad de reacción de cada anticuerpo en cada uno de los grupos estudiados.

La mediana de la intensidad del anticuerpo anti-H 290, en el grupo control fue de 3, mientras que en el grupo cáncer la mediana fue de 2. La comparación estadística de este parámetro indica que el nivel de intensidad observado en el grupo control es significativamente mayor al observado en el grupo cáncer ( $p=9.6 \times 10^{-3}$ ).

Asimismo, puede observarse que la mediana de la intensidad de reacción del anticuerpo anti-C 20 en el grupo control, es de 3; mientras que en el grupo cáncer alcanza 1.5, lo que indica que la expresión del extremo carboxilo de APC, en el grupo control, es significativamente mayor al observado en el grupo cáncer ( $p=1.0 \times 10^{-9}$ ).

La comparación estadística de la intensidad de reacción de los anticuerpos anti-H 290 y anti-C 20 en el grupo control no muestra diferencia estadística ( $p=0.246$ ), lo que indica que la intensidad de reacción del anticuerpo anti-H 290 es similar a la observada con el anticuerpo anti-C 20. En el grupo cáncer, esta comparación no alcanzó significancia estadística ( $p=0.091$ ); sin embargo, su interpretación biológica se indicará en la sección de Discusión.

#### LOCALIZACIÓN DE APC

En el epitelio bronquial normal, las células ciliadas mostraron una tinción citoplásmica con acentuación en los bordes marginales y apicales de la membrana celular. El patrón de tinción de los anticuerpos anti-H 290 y anti-C 20 fue similar (ver figura 5A y 5B). No se observó tinción nuclear con ninguno de los anticuerpos empleados.

En las células tumorales la tinción fue citoplásmica. La tinción con el anticuerpo anti-H 290 originó un patrón granular (ver: Figura 5C y 5E) mientras que con el anticuerpo anti-C 20 fue difuso. (ver: Figura 5D y 5F). Con el anticuerpo anti-H 290, se pudo observar que la mayoría de las células malignas mostraron un gradiente de tinción con tendencia a disminuir hacia la membrana celular.

Anticuerpo anti-H 290

Anticuerpo Anti-C 20

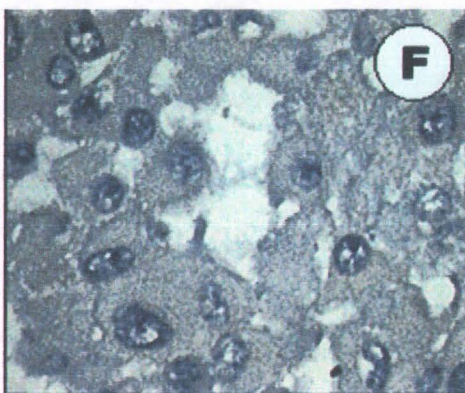
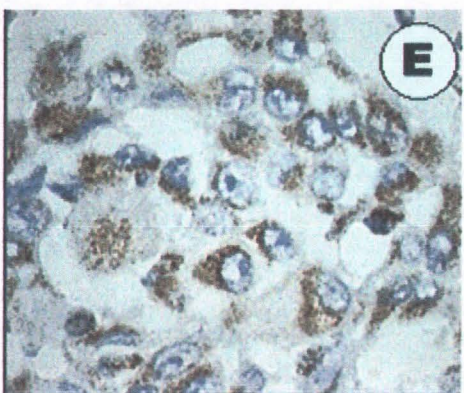
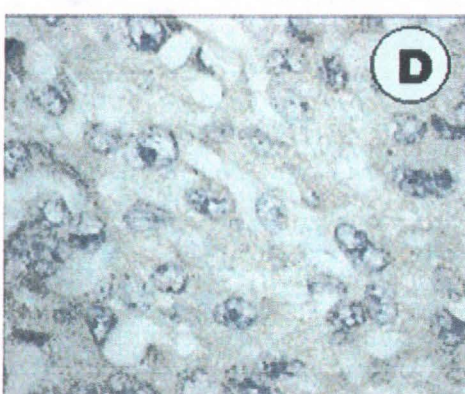
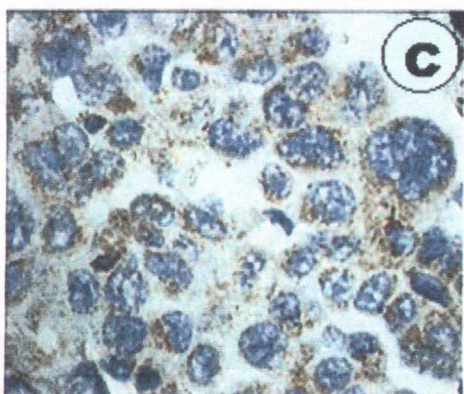
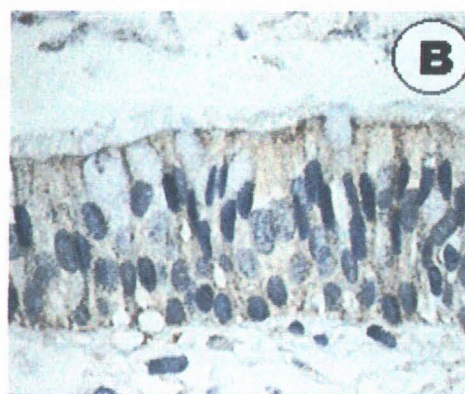
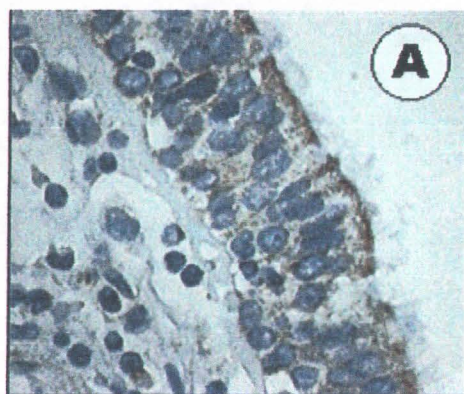


Figura 5. Inmunolocalización para observar el patrón de expresión de APC en tejido normal (A y B) y patológico (C-F). Aumento 100X

**Tabla 1.** EXPRESIÓN DE LOS EXTREMOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE APC EN TEJIDO NORMAL Y PATOLÓGICO

Anticuerpo	Grupo Control (n=19)		Grupo Cáncer (n=25)		<i>p</i> *
	casos	(%)	casos	(%)	
Anti-H 290	19	100	15	60	<0.001
Anti-C 20	19	100	6	24	<0.001
<i>P</i> *	<0.05		<0.05		

\**p* = probabilidad de  $H_0$

**Tabla 2.** FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE LOS EXTREMOS TERMINALES DE LA PROTEÍNA APC

CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES			
EXTREMO TERMINAL	AMINO+	AMINO-	TOTAL*
CARBOXILO+	24%	0%	24%
CARBOXILO-	36%	40%	76%
TOTAL*	60%	40%	100%

\*n = 25

**TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE CASOS DE ACUERDO A LA INTENSIDAD DE TINCIÓN DE APC**

Intensidad tinción	Anticuerpo			
	Grupo Control (n=19)		Grupo Cáncer (n=25)	
	Anti-H 290	Anti-C 20	Anti-H 290	Anti-C 20
Alta	58	63	20	0
Media	42	37	24	12
Baja	0	0	16	12
Nula	0	0	40	76
<b>TOTAL Casos</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**TABLA 4. MEDIANA DE LA INTENSIDAD DE TINCIÓN**

Anticuerpo	Grupo Control	Grupo Cáncer	<i>p</i>
Anti-H 290 <sup>+</sup>	3	2	< 0.001
Anti-C 20 <sup>+</sup>	3	1.5	< 0.001
<i>p</i>	> 0.05	> 0.05	



## DISCUSIÓN

La mayor parte de la literatura existente sobre la localización y/o determinación del estado de la proteína APC se ha obtenido en cáncer de colon (Smith, J.K., *et al.* 1993; Chop, M.A., *et al.* 1995; Neufeld, L.K., *et al.*, 1997; Iwamoto, M., *et al.* 2000; Hassan, A., *et al.* 2004). En cuanto a la distribución subcelular de APC, se ha reportado que la molécula completa se expresa predominantemente en el núcleo y bordes laterales de la membrana celular de los criptos normales, y que este patrón de expresión se pierde durante la progresión tumoral, observándose una tendencia a disminuir en la membrana y a aumentar en el citoplasma de pólipos y carcinomas (Anderson, B.C., *et al.* 2002); no obstante, la molécula puede encontrarse en la membrana celular, en el citoplasma, núcleo y ocasionalmente en el nucleolo de las células neoplásica de colon (Neufeld, L.K., *et al.*, 1997).

### TEJIDO PULMONAR NORMAL

En pulmón, el *status* de la proteína APC ha sido estudiado por Midgley (Midgley, A.C., *et al.* 1997) en secciones histológicas de epitelio bronquial normal embebidas en parafina. Este autor reporta que en las células ciliadas, la proteína APC se encuentra distribuida en el citoplasma con acentuación en los bordes apicales y basolaterales de la membrana plasmática y no observa tinción a nivel nuclear. Además, reporta que los patrones de tinción de los anticuerpos anti-H 290 y anti-C 20, son finamente punteados o difusos, por lo que concluye que son cualitativamente idénticos. Los resultados obtenidos por nosotros con relación a la localización, intensidad y patrón de tinción de APC en el epitelio bronquial concuerdan con este reporte previo. Por lo que podemos concluir que las células ciliadas expresan la proteína APC completa.

## TEJIDO PULMONAR MALIGNO

La expresión de la proteína APC ha sido estudiada en líneas tumorales derivadas de cáncer pulmonar por Smith y cols (Smith, J. K., *et al.* 1993). Estos investigadores observaron que en tumores esporádicos no colónicos, incluidas 9 líneas derivadas de pulmón, la proteína se encuentra completa y con distribución citoplásmica. Fuera de este trabajo, no tenemos conocimiento de que se hayan realizado estudios sobre la distribución y expresión de la molécula APC en carcinomas primarios de pulmón, por lo que éste sería el primer reporte.

Con respecto a la reactividad de ambos anticuerpos, sólo el 24% de los casos de carcinoma de células grandes expresaron la molécula completa de APC; en este rubro, la intensidad de la reacción siempre fue menor a la observada en las células ciliadas, siendo predominantemente medio para el anticuerpo anti-H 290, y bajo para el anticuerpo anti-C 20. A pesar de que la diferencia en intensidad, no alcanzó significancia estadística, este resultado es interesante por su interpretación biológica, la cual podría deberse a que el anticuerpo anti-H 290 reconoce el extremo amino-terminal que se mantiene tanto en moléculas completas como en truncadas. Por otro lado, la menor intensidad de tinción con el anticuerpo anti-C 20 puede deberse a la presencia de moléculas truncadas que carecen de la región carboxilo. Este sugerencia permite la coexistencia, en una misma célula, de moléculas APC completas y truncadas. De ser así, uno de los alelos podría albergar alguna mutación y, consecuentemente, producir proteínas truncadas, mientras que el otro alelo funciona de manera normal produciendo el fenotipo silvestre de APC.

Las moléculas de APC que reaccionaron con el anticuerpo anti-C 20 terminal, mostraron una distribución citoplásmica homogénea. En cambio, la molécula APC truncada que fue reconocida por el

anticuerpo anti-H 290, presentó una distribución citoplásmica granular. Tal vez el patrón de tinción y la distribución de la molécula APC este asociada con la alteración del gen.

Por otro lado, el 36% de los casos estudiados reaccionaron sólo con el anticuerpo que reconoce la porción amino-terminal de la molécula de APC, por lo que concluimos que este grupo presenta la molécula truncada. Estos resultados podrían deberse a que uno o ambos alelos del gen que codifica para APC podría estar siendo afectados por mutaciones truncantes, como ha sido observado por Rowan y cols (Rowan, A.J., *et al.*, 2000) en tumores colorectales. Según este autor, las mutaciones en la región del cluster de mutación están asociadas con la pérdida de heterocigocidad, mientras que las mutaciones fuera de esta región tienden a albergar mutaciones truncales. En este último aspecto, se ha reportado que los carcinomas de células grandes muestran pérdida de heterocigocidad en 5q21 con una frecuencia que varía entre el 30% y el 80% (Fong, K.M., *et al.*, 1995; Hosoe, S., *et al.*, 1994; Shiseki, M., *et al.*, 1996).

Nuestros resultados indican que la distribución de la molécula fue citoplásmica con un patrón granular con tendencia a generar un gradiente de distribución hacia la membrana nuclear de la célula tumoral, lo cual podría explicarse por la carencia de la región carboxilo, en la cual se encuentra el dominio de unión EB1, mediante este dominio, APC se une a los extremos más distales de los microtúbulos del citoesqueleto. La ausencia de este dominio en APC, probablemente induce la deslocalización de la proteína.

El 40% de los casos restantes no expresaron la molécula APC, ya que los anticuerpos empleados no reaccionaron con las células malignas. Una explicación posible para este comportamiento es que las células tumorales presenten delección completa de ambos alelos de APC, o bien que el gen presente una hipermetilación, lo que

silenciaría la expresión de la proteína correspondiente. Virmani y cols (Virmani, A.K., *et al.* 2001) han reportado que el carcinoma de células grandes presenta metilación aberrante de la región promotora de APC con una frecuencia del 48%.

Será necesario el empleo de técnicas moleculares que permitan asociar la participación de las alteraciones genómicas mencionadas con los cambios estructurales de APC observados por nuestro grupo.

En otro aspecto, la expresión citoplásmica y no nuclear de APC en el carcinoma de células grandes podría ser dependiente de los dominios conservados en la proteína APC mutada. Existen evidencias de que las moléculas truncadas de APC pueden formar homodímeros con las moléculas silvestres mediante el dominio de oligomerización (Joslyn, G., *et al.*, 1993). También se ha demostrado que tanto las formas mutadas como las silvestres de APC pueden unir a  $\beta$ -catenina, mediante sus dominios de 15 aminoácidos reiterados (Rubinfeld, *et al.* 1993; Su, L.K., *et al.* 1993), pero no la marca para su degradación (Munemitsu, *et al.*, 1995). Con base a lo antes expuesto, es posible que las moléculas de APC homodimerizadas o unidas a  $\beta$ -catenina se vean imposibilitadas para translocarse al núcleo.

En carcinomas colorectales, la localización de APC parece depender de la conservación de las secuencias de exportación nuclear (NES) (Rosin-Arbesfeld, R., *et al.* 2000 y 2003) y de localización nuclear (NLS) (Zhang, F. 2000, y 2001); sin embargo, la mayoría de las formas truncadas carecen de las NLSs centrales, y aún así pueden entrar al núcleo, gracias a una secuencia de importación mapeada hacia el dominio armadillo comprendiendo los aminoácidos 302 al 625. (Fabro, M. & Henderson, R. B. 2003). La ausencia de localización nuclear de APC en los carcinomas de células grandes podría deberse a mutaciones en esta secuencia o bien, podría estar

sugiriendo que el comportamiento de APC, en este carcinoma pulmonar es diferente al descrito en carcinomas colorectales.

Finalmente, puede decirse que el objetivo de este trabajo fue contestar dos preguntas importantes en el terreno del cáncer pulmonar: la primera es, si APC se expresa o no en carcinoma pulmonar de células grandes, y la segunda es, en caso de que se exprese, determinar si se expresa completa o truncada. De acuerdo a nuestros resultados, la respuesta a la primera pregunta es que en nuestra muestra de tumores de células grandes, APC se encontró expresada con una frecuencia del 60%, y en el en 40% restante, la proteína no se encontró expresada. La respuesta a la segunda pregunta es que la molécula se encuentra completa en 24% de los casos, e incompleta en 36% de los mismos; por lo que puede considerarse que se cumplió con los objetivos planteados.

## **CONCLUSIONES**

En la muestra de carcinomas de células grandes estudiada, APC se expresó con una frecuencia del 60%, y en el 40% restante la proteína no se expresó.

La molécula de APC se encontró completa en 24% de los casos e incompleta en el 36% de los mismos.

La distribución intracelular de la proteína APC en carcinoma pulmonar de células grandes es exclusivamente citoplásmica.

La mediana de la intensidad de reacción del anticuerpo dirigido al extremo amino-terminal, fue menor en los carcinomas de células grandes respecto al control.

En la muestra de carcinoma pulmonar de células grandes, la proteína supresora de tumor APC (Adenomatous Polyposis Coli) se encontró afectada en el 76% de los casos estudiados.

## GLOSARIO

<b>15 aa R</b> Dominios de 15 aminoácidos reiterados
<b>20 aa R</b> Dominios de 20 aminoácidos reiterados
<b>ABC</b> Complejo avidina-biotina
<b>APC</b> Poliposis Adenomatosa del Colon
<b>Asef</b> Factor de intercambio del nucleótido guanina estimulado por APC.
<b>B56</b> Subunidad regulatoria de la proteína fosfatasa 2A (PP2A),
<b>C-20</b> Anticuerpo contra la región carboxilo-terminal de APC
<b>CDH1</b> Gen de la Cadherina-E
<b>DA</b> Dominio armadillo
<b>DAB</b> Diamino benzidina
<b>DB</b> Dominio básico
<b>Dix</b> Dominio en la parte central de la Axina para homodimerización
<b>DO</b> Dominio de oligomerización
<b>DVL</b> Disheveled, proteína participante en la ruta Wnt
<b>EB1</b> Dominio de union a la proteína End Binding 1
<b>EGF</b> Factor de crecimiento epidermoide

<b>EGFR</b> Receptor del factor de crecimiento epidermoide; familia de receptores tirosin cinasa que comprende cuatro miembros: ErB1, también llamado EGFR; ErB2, referido como c-Neu; ErB3 y ErB4.
<b>GAP</b> Proteína activadora de GTPasa
<b>GDP</b> Difosfato de guanosina
<b>GEF</b> Factor de intercambio del nucleótido guanina
<b>GSK-3<math>\beta</math></b> Enzima glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$
<b>GTP</b> Trifosfato de guanosina
<b>GTPasa</b> Guanosin trifosfatasa:
<b>H-290</b> Anticuerpo contra la región amino-terminal de APC
<b>HDLG</b> Dominio de unión a la proteína Human Discs Large, homóloga de la proteína supresora de tumor "Discs Large" en <i>Drosophyla</i>
<b>HVA</b> secuencia de aminoácidos integrada por Histidina, Valina y Alanina.
<b>LOH</b> Pérdida de la heterocigocidad (loss of Heterocigosity): inactivación física o funcional de un alelo.
<b>LRP-5/6</b> Lipoproteínas relacionadas a receptor 5 y 6 .
<b>MMP-7</b> Metaloproteinasa de matriz 7 (matrilisina)
<b>NES</b> Secuencia de exportación nuclear
<b>NLS</b> Secuencia de localización nuclear



<b>P-450</b> Familia de enzimas destoxificadoras p53 con capacidad para inducir arresto del ciclo celular o apoptosis.
<b>PAH</b> Hidrocarburos policíclicos aromáticos
<b>PBR</b> Región polibásica
<b>PBS</b> Solución salina de fosfato
<b>PP2A</b> Enzima que une axina mediante su subunidad catalítica B56.
<b>RCM</b> Región del Cluster de Mutación
<b>SAMP</b> Secuencia de aminoácidos formada por Serina, Alanina, Metionina y Prolina.
<b>TCF/LHF</b> Factor de transcripción de células T / factor Linfoide amplificador
<b>TGF-<math>\alpha</math></b> Factor-alfa transformante del crecimiento
<b>WHO</b> Organización Mundial de la Salud
<b>Wnt</b> Familia de proteínas altamente conservadas reguladoras de la proliferación y diferenciación celular durante la embriogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, B.C., Neufeld, L.K. & White, L.R. (2002). Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:8683-88
- Barth, I.M.A., & Nelson, J.W. (2002). What can humans learn from flies about adenomatous polyposis coli?. *BioEssays* 24:771-74
- Beavon, I.R.G. (2000). The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. *Eur. J. Cancer* 36:1607-20
- Behrens, J., von Kries, P.J., *et al.* (1996). Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Science* 382:638-42
- Bremnes, R.M., Veve, R., *et al.* (2002). The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 36:115-24
- Campbell, R.J. & Pignatelli, M. (2002). Molecular histology in the study of solid tumours. *J. Clin. Pathol.* 55:80-82
- Cerejido, M., Valdés, J., *et al.* (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu. Rev. Physiol.* 60:161-77
- Chop, M.A., Christine, L., *et al.* (1995). Immunodetection of the presence or absence of full-length APC gene product in human colonic tissues. *Anticancer Res.* 15:991-98
- Ciani, L., Krylova, O., *et al.* (2003). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: Dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *J. Cell Biol.* 164:243-53
- Cooper, C.A., Bubb, V.J., *et al.* (1996). Loss of heterozygosity at 5q21 in non-small cell lung cancer: a frequent event but without

- evidence of apc mutation. *J. Pathol.* 180:33-7
- D'Amico, D., Carbone, D.P., *et al.* (1992). Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. *Cancer Res.* 52:1996-9
- DeVita, T.V. Jr., Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (1989). *Cancer principles & practice of oncology.* J. B. Lippincott Company, Philadelphia tercera edición. Cap. 7-8, pp. 98-132
- Dormans J.A.M.A., (1996). Morphology, function, and response of pulmonary type I cells: a review. *Inhal. Toxicol.* 8:521-36
- Dormans J.A.M.A., Van Bree, L. (1995) Function and response of type II cells to inhaled toxicants. *Inhal. Toxicol.* 7:319-342.
- Esufali, S. & Bapat, B. (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of  $\beta$ -catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 23:8260-71
- Fabbro, M. & Henderson, R. B. (2003). Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp. Cell Res.* 282:59-69
- Farzan, S. (1985). *A concise handbook of respiratory diseases.* Reston Publishing Company, Inc. A Prentice Hall Company Reston, Virginia. Segunda edición . Cap. 18 pp. 173-78
- Fearnhead, N.S., Britton M.P. & Bodmer, W.F. (2001). The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* 10:721-33
- Fong, K.M., Zimmerman, P.V. & Smith, P.J. (1995). Tumor progression and loss of heterozygosity at 5q and 18q in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 55:220-3

- Furuuchi, K., Mitssuhiro, T., *et al.* (2000). Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers. *Am. J. Pathol.* 156:1997-2005
- Greenberg, K.A., Yee, H. & Rom, N.W. (2002). Preneoplastic lesions of the lung. *Respir. Res.* 3:20-9
- Groden, J., Tliveris, A., *et al.* (1991). Identification and characterization of the familial Adenomatous Polyposis Coli gene. *Cell* 66:589-600
- Ham, W.A. (1960). Tratado de histología. México:Interamericana. Séptima edición, cap. 23 pp. 670-93
- Hassan, A., Yerian, L. M., *et al.* (2004). Immunohistochemical evaluation of Adenomatous Polyposis Coli,  $\beta$ -Catenin, c-Myc, Cyclin D1, p53, and retinoblastoma protein expression in syndromic an sporadic fundic gland polyps. *Human Pathol.* 35:328-34
- Hollings, N. & Shaw, P. (2001). Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur. Respir. Mon.* 17:120-50
- Horii, A., Nakatsuru, S., *et al.* (1992). Frequent somatic mutations of APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 52:6696-8
- Hosoe, S., Ueno, K., *et al.* (1994). A frequent deletion of chromosome 5q21 in advanced small cell and non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 54:1787-90
- Iwamoto, M., Ahnen, J.D., *et al.* (2000). Expression of  $\beta$ -catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 21:1935-40
- Jones, J.G.L. & Veale, B.R. (2003). Redistribution of  $\beta$ -catenin in response to EGF and lithium signaling in human oesophageal squamous carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int.* 3:13-24

- Joslyn, G., Richardson, D.S., *et al.* (1993). Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11109-13
- Kawanishi, M., Kohono, T., *et al.* (1997). Allelotype and replication error phenotype of small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 18:2057-62
- Kawasaki, Y., Takao, S *et al.* (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 289:1194-97
- Kinzler, K.W., Mef, C., *et al.* (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661-65
- Korinek, V., Barker, N., *et al.* (1997). Constitutive transcriptional activation by a  $\beta$ -Catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 275:1784-87
- Levitzki, M., (1987). Fisiología pulmonar. México: LIMUSA, Cap. 1 pp 13-23
- Matsumine, A., Ogai, A., *et al.* (1996). Binding of APC to the human homologue of the *Drosophila* Discs Large tumor suppressor protein. *Science* 272:1020-23
- McPherson, J.D., Morton, R.A., *et al.* (1994). Assignment of the  $\alpha$ -catenin gene (CTNNA1) to chromosome 5q21-q22. *Genomics* 19:188-90
- Midgley, A.C., White, S., *et al.* (1997). APC expression in normal human tissues. *J. Pathol.* 181:426-33
- Minna, J.D., Roth, J.A. & Gazdar, A.F. (2002). Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 1:49-52
- Mitic, L.L. & Anderson, J.M. (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60:121-42

- Morin, J.P., Sparks, B.A. *et al.* (1997). Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 275:1787-90
- Munemitsu, S., Albert, I., *et al.* (1995). Regulation of intracellular  $\beta$ -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3046-50
- Nelson, J.W. & Nusse, R. (2004). Convergence of  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483-87
- Neufeld, L.K., & White, L.R. (1997). Nuclear and cytoplasmic localizations of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3034-39
- Nicolson, G.L. (1979). Metástasis cancerosas. *Investigación y Ciencia* 32:22-33
- Nishisho, Y., Nakamura, Y., *et al.* (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253:665-68
- Ohgaqui, H., Kros, J.M., *et al.* (2004). APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett.* 207:197-203
- Pecina-Slaus N. (2003). Tumor supressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International.* 3:17-23
- Potter, E., Bergwitz, C. & Brabant, G. (1999). The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocrine Reviews* 20:207-39
- Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., *et al.* (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls  $\beta$ -catenin function in transcription. *EMBO J.* 22:1101-13
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F. & Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature*

406:1009-12

- Rowan, A.J., Lamlum, H. *et al.* (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3352-57
- Rubinfeld, B. Sousa. B., *et al.* (1993). Association of the APC gene product with  $\beta$ -catenin. *Science* 262:1731-34
- Rubinfeld. B., Robbins, P., *et al.* (1997). Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790-93
- Schneeberger, E.E. & Lynch, D.R. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol.* 286:C1213-C1228
- Seeling, J.M. Miller, R.J. *et al.* (1999). Regulation of  $\beta$ -catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283:2089-91
- Shiseki, M., Kohono, T. *et al.* (1996). Comparative allelotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17:71-7
- Singer, J.S (2004). Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev. Physiol.* 66:1-27
- Smith, J.K., Johnson, A.K., *et al.* (1993). The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2846-50
- Staehein, L.A. & Hull, E.B. (1978). Uniones intercelulares. *Investigación y Ciencia.* 22:77-86
- Su, L.K., Volgestein, B. & Kinzler, K.W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262:1734-37
- Tickenbrok. L., Koßmeier, K., *et al.* (2003). Differences between the interaction of  $\beta$ -catenin with non-phosphorylated and single-mimicked phosphorylated 20-amino acid residue repeats of the

APC protein. *J. Mol. Biol.* 327:359-67

- Trosko, E.J. & Ruch, J.R. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* 3:d208-36
- Turksen, T. & Tammy-Claire, T. (2004). Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117:2435-47
- Virmani, A.K., Rathi, A., *et al.* (2001). Aberrant methylation of the *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 7:1998-2004
- Webster, C.K. & White, L.R. (1995) The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 272:50-7
- Weibel, R.E. (1973). Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol. Rev.* 53:419-82
- Wijnhoven, L. P. B., Dinjens M.N.W. & Pignatelli, M. (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87:992-1005
- Zhang, F. White, L.R. & Neufeld, L.K. (2000). Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:12577-82
- Zhang, F. White, L.R. & Neufeld, L.K. (2001) Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell Biol.* 21:8143-56
- Zochbauer-muler, S., Gazdan, F. A. & Minna, D.J. (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 64:681-708