

19
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION INMUNOHISTOQUIMICA DE
E- Y N-CADHERINA EN DIFERENTES TIPOS
HISTOLOGICOS DE CANCER PULMONAR.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICO - BIOLOGICA
P R E S E N T A ;
GUADALUPE LEONOR CARDENAS FUENTES



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

269120

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FALTA PAGINA

No. 7

DEDICATORIAS

A mis hijos:

Sean Augusto y Julia Estefanía
por que son tesoro de mi vida
y el motor que me impulsa a seguir.

A mi madre:

Por tu ejemplo de trabajo, perseverancia
y por que eres la mejor de mis amigas.

A mi Padre:

Por tu ejemplo de nobleza, orgullo
y rectitud.

A mi hermano Juan Carlos:

Por que siempre has creído en mi
y aunque estés lejos continuamos unidos.

Gracias Dios por darme la vida, por las cosas buenas
que tengo por los obstáculos que me hicieron crecer y
madurar por el coraje y la fuerza de seguir siempre
adelante y de frente además por darme una Familia tan
maravillosa.

Al Dr. Sullivan:

Con especial agradecimiento y admiración por que a forjado en mi carrera profesional la excelencia y el profesionalismo y por permitirme colaborar en este proyecto tan importante y trascendente.

A toda la gente que participó en mi formación académica, a la Facultad de Química y a la UNAM.

A mis amigos:

Alejandra Belmont, Chala, Carmelita, Olga, Cecilia, Dolores, Ulises, Verónica, Rafael, Tere, Isabel y Fausto Rivero, Erika Garay, Verónica Nekis, Elisa, Diana, Ale Hdz y Rosario, Ale Nieto, Juan Carlos y todos mis compañeros de la Facultad de Química con quienes viví gratas experiencias, Gracias por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

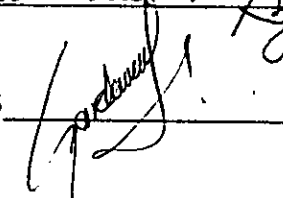
Jurado asignado:

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Presidente | JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ |
| Vocal | ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS |
| Secretario | LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO |
| 1er. Suplente | ROSANA PELAYO CAMACHO |
| 2do. Suplente | PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ |

Sitio donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO DE CANCER PULMONAR
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Asesor: Dr. JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ 

Sustentante: GUADALUPE L. CARDENAS FUENTES 

| | Página |
|--|--------|
| INDICE | 3 |
| INTRODUCCION | 6 |
| 1. ADHESION CELULAR | 6 |
| 2. MOLECULAS DE ADHESION | 7 |
| Generalidades de las moléculas de adhesión | 8 |
| 2.1 Integrinas | 8 |
| 2.2 Inmunoglobulinas | 10 |
| 2.3 Selectinas | 12 |
| 2.4 CD44 | 13 |
| 3. FAMILIA DE LAS CADHERINAS | 14 |
| 3.1 Identificación inmunológica de las moléculas de adhesión | 14 |
| 3.2 Identificación de las subclases de cadherinas | 15 |
| 3.3 Clasificación | 15 |
| 3.4 Cadherinas clásicas | 16 |
| 3.4.1 Estructura | 16 |
| 3.4.2 Uniones adherentes | 17 |
| 3.5 Complejo cadherinas-cateninas | 18 |
| 3.5.1 Cateninas: características estructurales | 20 |
| 4. DISTRIBUCION DE LAS CADHERINAS EN TEJIDO HUMANO | 24 |
| 4.1 Expresión de las cadherinas clásicas en tejidos | 24 |
| 4.2 Expresión de las cadherinas durante la morfogénesis del tejido pulmonar | 25 |

| | |
|---|----|
| ANTECEDENTES | 27 |
| 5. CANCER | 27 |
| 5.1 Oncogenes y genes supresores | 27 |
| 5.2 Capacidad invasiva y metástasis | 28 |
| 5.3 Cáncer pulmonar | 29 |
| 5.3.1 Histogénesis del cáncer pulmonar | 31 |
| 5.4 Cáncer de pulmón en México | 36 |
| 6. FUNCION E IMPORTANCIA BIOLOGICA DE LAS E- y N-CADHERINAS | |
| 6.1 Función organizadora y supresora de la E-cadherina | 37 |
| 6.2 N-cadherina en el desarrollo neural y la miofibrinogénesis | 38 |
| 7. CADHERINAS EN CANCER | 39 |
| 7.1 Adhesión celular en tumores | 39 |
| 7.2 Expresión de la E-cadherina en tumores | 40 |
| 7.3 E-cadherina como molécula supresora de la invasión | 41 |
| 7.4 Expresión de la N-cadherina en células epiteliales normales y en células tumorales | 42 |
| 8. JUSTIFICACION | 43 |
| 9. HIPOTESIS | 44 |
| 10. OBJETIVO GENERAL | 45 |
| 10.1 Objetivos particulares | 45 |
| MATERIAL Y METODOS | 46 |
| 11. MATERIAL EMPLEADO EN EL METODO INMUNOHISTOQUIMICO | 46 |
| 12. CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE RESULTADOS | 48 |
| 13. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS | 50 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 51 |
| 14. ESTANDARIZACION DE PARAMETROS VARIABLES | 51 |
| 14.1 Dilución óptima de los segundos anticuerpos | 51 |
| 14.2 Dilución óptima del complejo estreptoavidina-biotina | 52 |
| 14.3 Dilución óptima de los anticuerpos primarios | 53 |
| 15. ANALISIS DE RESULTADOS | 54 |
| 15.1 Expresión de E- y N-cadherinas | |
| en cortes histológicos de epitelio pulmonar normal | 54 |
| 15.2 Expresión de E- y N-cadherinas | |
| en carcinomas pulmonares | 56 |
| 16. RELACION DE TABLAS Y FIGURAS | |
| 16.1 Tabla 1 | 66 |
| 16.2 Fig 2 | 67 |
| 16.3 Fig 3 | 68 |
| 16.4 Fig 4 Relación de la expresión de E- y N-cadherina | |
| por caso en adenocarcinomas | 70 |
| 16.5 Fig 5 Relación de la expresión de E- y N-cadherina | |
| por caso en carcinomas epidermoides | 71 |
| 16.6 Fig 6 Relación de la expresión de E- y N-cadherina | |
| por caso en carcinomas de células grandes | 72 |
| | |
| DISCUSION | 74 |
| | |
| CONCLUSIONES | 80 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | 81 |
| | |
| APENDICE | 89 |

INTRODUCCION

1. ADHESION CELULAR

La adhesión celular es una propiedad crucial que se presenta desde los estadios tempranos del desarrollo embrionario, durante la morfogénesis y organogénesis y en el tejido adulto es condicionante en la diferenciación de los tejidos. Una alteración en esta propiedad de adhesión conduce a estados de desequilibrio; tanto en el tejido embrionario produciendo un desarrollo anormal, como en el tejido adulto en donde se favorece la pérdida de la diferenciación (Siu 1996). Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular están estrictamente reguladas por mecanismos de adhesión, que determinan la polaridad y la forma celular, así como la arquitectura del tejido, inhibiendo a su vez la motilidad celular e induciendo la expresión de receptores para factores de crecimiento que consecuentemente afectan la proliferación celular (Phina 1996).

Se ha demostrado que en las neoplasias se presenta un desorden en la adhesión celular que se traduce como un desarreglo en la arquitectura del tejido y desdiferenciación (Pignatelli 1994).

Las unidades funcionales de la adhesión celular son típicamente complejos multiproteicos integrados por tres clases generales de proteínas: 1. Moléculas de adhesión celular/receptores de adhesión, 2. Proteínas de matriz extracelular y 3. Proteínas de placa citoplasmática y membrana periférica (Gumbiner 1996). Este estudio se enfocará principalmente a moléculas de adhesión y específicamente a la familia de las cadherinas.

2. MOLECULAS DE ADHESION

Las moléculas de adhesión son generalmente glucoproteínas transmembranales, que median las uniones en la superficie celular y determinan la especificidad de reconocimiento entre célula-célula y célula-matriz extracelular (Gumbiner 1996). Existen dos grandes categorías en las que se clasifican estas moléculas: 1) las moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) y 2) las moléculas de adhesión de sustrato celular ó célula-matriz (SAMs) (Pignatelli 1994). Estos receptores de adhesión de superficie celular se agrupan de acuerdo a su similitud estructural en cuatro familias:

- a) Integrinas
- b) Selectinas
- c) Cadherinas
- d) Superfamilia de las inmunoglobulinas

(Kemler 1993, Pignatelli 1994, Gumbiner 1996, Siu 1996).

Actualmente, se añade un grupo más de moléculas que también poseen función de adhesión celular, y comprende moléculas como las glucosiltransferasas, lectinas endógenas y glucosidasas que se ha visto que están involucradas en procesos metastásicos. Un elemento importante de este grupo de moléculas es:

- e)CD 44.

(Tang 1994).

En general estas familias de moléculas de adhesión son bioquímica, genética y estructuralmente diferentes entre sí y bajo ciertas circunstancias adquieren una función relacionada, ya que generalmente, los miembros de una familia son ligandos entre sí pero pueden asociarse e interactuar con receptores de otra familia; también pueden actuar coordinadamente mediando los mismos

procesos, o activar eventos que conducen a la expresión y activación de otros receptores y mediadores celulares, como es el caso de la activación de receptores para factores de crecimiento y enzimas proteolíticas (Phina 1996).

GENERALIDADES DE LAS MOLECULAS DE ADHESION

2.1 *Familia de Integrinas*

Los miembros de la familia de las integrinas son glucoproteínas integrales de membrana, constituídas estructuralmente por cadenas α y β asociadas no covalentemente y que espacialmente conforman dímeros, las integrinas se expresan principalmente en células epiteliales pero pueden expresarse en otros tipos celulares. Existen por lo menos 15 cadenas α y 8 cadenas β las cuales pueden interactuar en una amplia gama de combinaciones. Generalmente se clasifican de acuerdo a su cadena β pero, ya que una cadena α puede asociarse a varias cadenas β diferentes se prefiere dar una clasificación de acuerdo a su función. Las subunidades β de todas las integrinas son muy similares entre ellas ya que comparten una secuencia de aminoácidos homóloga (40-48%) con características estructurales específicas bien conservadas en una amplia variedad de especies incluyendo a los mamíferos, aves, anfibios, insectos y hongos (Hynes 1992).

En general, se ha demostrado que existe una asociación preferencial de algunas cadenas α con ciertas cadenas β , lo que da lugar a la formación de tres subfamilias: cuando la cadena β 1 (CD26) se asocia a las cadenas α 1 a la 8 se genera la *subfamilia de las integrinas* β 1 o VLA (del inglés Very Late Antigens); cuando la cadena β 2 (CD18) se asocia con las cadenas α L, α M y α X se constituye la *subfamilia de las integrinas* β 2 o leucocitarias, que originan los receptores de leucocitos LFA-1 (Leukocyte Function Associated molecule-1), Mac-1, y p150,95 (Albelda 1990) y por último si la cadena β 3 se asocia

preferentemente con αV (CD41/CD51) se forma la *subfamilia* $\beta 3$ o de las citoadhesinas que se expresan fundamentalmente en células endoteliales y plaquetas y consiste de la glucoproteína de plaquetas GPIIb/IIIa y del receptor de vitronectina (Albelda 1990).

Las integrinas se expresan abundantemente en la superficie celular y su distribución en el tejido y especificidad se manifiestan empleando anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de sus cadenas. La mayoría de ellas son SAMs que funcionan como receptores para las proteínas de matriz extracelular, incluyendo colágeno, laminina y fibronectina (Hynes 1992). Algunas de ellas tienen especificidad por el mismo ligando; ej: $\alpha 1\beta 1$ se une a laminina o colágeno, $\alpha 6\beta 1$ se une a laminina y $\alpha 3\beta 1$ se une a laminina, colágeno y fibronectina. Algunas veces pueden funcionar como CAMs que principalmente se encuentran en leucocitos, mediando la adhesión célula-célula de manera heterotípica con otras moléculas que son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que funcionan como ligandos, como son: las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1), (ICAM-2), (ICAM-3) y vascular (VCAM-1) y CD31; muy pocas integrinas son capaces de funcionar a la vez como SAMs y CAMs por ejemplo: $\alpha M\beta 2$ (MAC-1).

Existen sitios de reconocimiento que son críticos para el funcionamiento de las integrinas cómo es la secuencia de arginina, glicina y ac. aspártico (RGD) el que les permite unir ligandos como el colágeno tipo 1, laminina, fibronectina, trombospondina, fibrinógeno y vitronectina que son importantes durante los procesos de inflamación y desarrollo.

En este sentido se ha visto que las integrinas juegan un papel importante durante la adhesión-migración y su función es crítica en la inducción y diferenciación de células *in vitro*, están también involucradas en procesos de crecimiento celular, diferenciación, formación de uniones y polaridad celular (Albelda 1990). Existe evidencia de que en las líneas celulares transformadas y en tumores se presentan cambios en la expresión o función de las integrinas; lo que

se asocia a su desdiferenciación y conducta alterada, estas investigaciones se han realizado a nivel genético y molecular en estudios *in vivo* e *in vitro* (Hedrick 1993, Pignatelli 1994). Con respecto a su funcionalidad, las integrinas son muy importantes ya que en la enfermedad de la Deficiencia de adhesión en leucocitos (LAD) se presenta un defecto en la subunidad β de las integrinas lo que se ha asociado a que los individuos presenten infecciones bacterianas recurrentes (Larson 1990).

2.2 Superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSf)

Los miembros que integran esta familia de moléculas poseen en común una estructura homóloga a las inmunoglobulinas que consiste de 70 a 110 residuos de aminoácidos organizados en dos cadenas antiparalelas β -plegadas estabilizadas por puentes disulfuro.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el receptor de la célula T, el receptor para factor de crecimiento de plaquetas y el receptor del factor estimulador de colonias se incluyen dentro de esta familia, así como otras moléculas importantes en la adhesión celular: molécula de adhesión celular neural (NCAM), molécula de adhesión celular vascular (VCAM), molécula de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3), molécula de adhesión celular endotelial (PECAM-1/CD31) y el antígeno carcinoembrionario (CEA). Las moléculas de la IgSf median la adhesión de manera homotípica ó algunas veces de manera heterotípica es decir entre dos diferentes tipos celulares.

La NCAM se expresa en una amplia variedad de tipos celulares, principalmente de origen neural y mesénquimatoso.

La expresión de VCAM es inducida por citocinas en algunas células endoteliales y sirve como un receptor para la integrina $\alpha 4\beta 1$, ie, VLA-4.

Las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 se expresan en células endoteliales y también en leucocitos pero en diferente proporción, la ICAM-2 no está mediada

por citocinas mientras que la expresión de ICAM-1 es mediada por IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y LPS (lipopolisacárido). La molécula ICAM-3 muestra un patrón de expresión diferente con respecto a ICAM-1 y 2 ya que se expresa en altos niveles en los monocitos, linfocitos y neutrófilos y en células presentadoras de antígeno; su ligando es LFA-1. La molécula ICAM-3 esta involucrada en los procesos de adhesión celular, señales de transducción y en la respuesta inmune. Desde el punto de vista fisiológico la molécula ICAM-1 se encuentra en forma activa en suero y se encuentra elevada en pacientes con síndromes de inflamación como choque séptico, LAD, cáncer y transplantes.

La molécula PECAM-1/CD31 se expresa preferentemente en células endoteliales y plaquetas, está involucrada en el proceso de migración transendotelial del leucocito en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Otro representante importante dentro de esta familia de receptores es el antígeno carcinoembrionario (CEA), el cual fué descubierto en 1965 como una glucoproteína oncofetal de 180 kD presente en el suero de pacientes con carcinoma de colón. Desde entonces fue clonado y demostró ser un miembro de la IgSf, media la agregación homotípica de líneas celulares de carcinoma de colón de una manera calcio independiente, es utilizado ampliamente como marcador tumoral y también funciona cómo una molécula de adhesión accesoria mediando las interacciones de la matriz celular; se ha visto que se localiza en los sitios de contacto entre célula-célula *in situ*. Recientemente se ha demostrado que las células tumorales colorectales en estadio invasivo (donde se requiere una disminución de la adhesión) expresan 2.6 veces más mRNA del CEA que en las células tumorales de la superficie luminal. Esto sugiere que el CEA puede tener una función dual; cómo proteína epitelial de adhesión celular o alternativamente como una proteína de antiadhesión, dependiendo si esta en la unión celular o es secretada al microambiente extracelular. (Pignatelli 1994, Hedrick 1993, Williams 1988, Tang 1994)

2.3 Familia de Selectinas

Estructuralmente las selectinas se caracterizan por ser glucoproteínas transmembranales compuestas por tres dominios extracelulares: un dominio N-terminal parecido a una lectina tipo C (dominio de reconocimiento a carbohidratos), seguido de un dominio homólogo a EGF (factor de crecimiento epidérmico), otro dominio que consta de un número variable de secuencias homólogas a proteínas del complemento; un dominio transmembranal y un pequeño dominio citoplásmico. En presencia de calcio el dominio parecido a lectina utiliza como ligandos a carbohidratos fucosilados y a moléculas conjugadas con ac. siálico. Las selectinas median las interacciones heterotípicas entre células sanguíneas y células endoteliales, como en el proceso de "anclaje" y adhesión del leucocito; esta interacción selectina/carbohidrato es muy lábil lo que permite que los leucocitos puedan rodar a través del endotelio vascular en dirección hacia el flujo sanguíneo.

La familia de selectinas esta constituida por 3 moléculas relacionadas, la P-selectina conocida como GMP-140, CD62P ó PADGEM; la L-selectina conocida como CD62L, LECAM-1, LAM-1 ó gp90^{MEL-14} y la E-selectina conocida como ELAM-1 ó CD62E que se encuentran presentes en células endoteliales activadas y proporcionan un sitio de unión para las células que presentan el ligando apropiado (Pignatelli 1994, Bevilacqua 1991).

Desde el punto de vista fisiológico, las selectinas son muy importantes ya que en la enfermedad de la Deficiencia de adhesión en leucocitos (LAD II) en donde los ligandos para las selectinas estan ausentes, los neutrófilos no llegan a los sitios de inflamación impidiendo que funcionen como células efectoras del sistema inmune.

2.4 Moléculas CD44

La familia de moléculas CD44 se encuentra constituida por un grupo de moléculas relacionadas, comparten una estructura primaria similar y se encuentran muy bien conservadas entre las diferentes especies. El gen CD44 consiste de 20 exones de los cuales sólo se expresan 10 que componen a la estructura CD44H. Los otros 10 exones adicionales (v1-v10) codifican para las regiones extracelulares. En teoría, la gama de combinaciones que presentan estos exones puede exceder de 100. Recientemente se han identificado 30 de sus isoformas.

El receptor de adhesión CD44 es una glucoproteína de superficie celular involucrada en las interacciones célula-célula y célula-componentes de la matriz extracelular (ECM). Esta molécula posee como ligando principal al hialuronidato pero puede tener otros ligandos como fibronectina, colágeno y otros proteoglicanos sulfatados. Esta molécula está involucrada en procesos de hematopoyesis, progresión de tumores, activación de linfocitos, señales de transducción, procesos de inflamación y en la embriogénesis.

La isoforma de 85-90 kD CD44H también llamada gp90^{Hermes}, pgp-1 (glicoproteína fagocítica-1) y H-CAM (receptor de hialuronidato) se expresa en la superficie de las células hematopoyéticas (linfocitos B y T, monocitos y neutrófilos), fibroblastos y células del sistema nervioso central (SNC).

La isoforma de 150 kD está restringida a ciertos grupos de células epiteliales, recientemente se ha demostrado que una línea celular de carcinoma pancreático de rata y una línea celular de sarcoma adquieren potencial metastásico cuando expresan una variante de CD44. La sobreexpresión de cierta variante de CD44 y niveles elevados de su mRNA se han asociado con el proceso de metástasis en un amplio rango de tumores humanos y se sugiere que la expresión aberrante de CD44 puede respaldar el pronóstico y conducta metastásica de ciertos tumores humanos (Pignatelli 1994).

3. FAMILIA DE CADHERINAS

Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio (CAMs), con un peso molecular aproximado de 120-140 kD. Estas CAMs son importantes durante el proceso de gastrulación, morfogénesis, y organogénesis de los tejidos, además de mantener la arquitectura de ellos (Takeichi 1991).

3.1 *Identificación inmunológica de las moléculas de adhesión*

Estas moléculas de adhesión inicialmente se identificaron por medio de anticuerpos dirigidos en contra de las membranas celulares que se sugería expresaban moléculas de adhesión. Estos anticuerpos con especificidad a las moléculas de adhesión se esperaba que inhibieran o bloquearan la adhesión celular y si ésto ocurría, se consideraba que se identificaban moléculas de adhesión.

Estos anticuerpos se obtenían inyectando células F9 de teratocarcinoma de ratón en conejos, el suero resultante contenía anticuerpos que eran capaces de bloquear la adhesión intercelular de las células F9. Posteriormente se emplearon anticuerpos monoclonales que bloqueaban la adhesión intercelular de las células F9. Este anticuerpo monoclonal denominado ECCD-1, tiene la propiedad de disociar colonias de células F9 de teratocarcinoma y por ensayos de inmunoblot se ha demostrado que este anticuerpo reconoce a una glucoproteína de 124 kD cuyo tamaño es exactamente igual al que reconocía el antisuero (antiF9) producido en conejo en contra de las células F9, a ésta molécula común se le designó como *cadherina*.

En estudios posteriores se identificó la uvomorulina (Vestweber 1985), molécula presente en embrión de ratón y la Cell-CAM 120/80 presente en células de carcinoma de mama humano, otra molécula similar se identificó en células epiteliales de perro y se le designó como Arc-1.

Las moléculas descritas anteriormente presentan propiedades similares: son sensibles a calcio, en ausencia de calcio son degradadas por tripsina y muestran el mismo patrón de distribución en células epiteliales; consecuentemente se sugiere que estas moléculas son idénticas u homólogas entre las diferentes especies de mamíferos estudiados (Takeichi 1988).

3.2 Identificación de las subclases de cadherinas

Las moléculas cadherina, uvomorulina, Cell-CAM120/80, Arc-1 y L-CAM, presentes en las células epiteliales de las diferentes especies, muestran una función de adhesividad celular pero ésta también se presentaba en tejidos neurales y en fibroblastos, los cuales no eran reconocidos por el anticuerpo monoclonal ECCD-1; por lo tanto, se produjeron anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de células de cerebro de ratón y de pollo designados como: NCD-1 y NCD-2, los cuales reconocían a la N-cadherina presente en las células de tejido neural de dichas especies. Posteriormente se produjo otro anticuerpo monoclonal, el PCD-1 con especificidad en contra de la línea celular extraembrionaria de ratón (clona PSA5-E), a este anticuerpo se le designó como P-cadherina. Los anticuerpos N- y P-cadherina también reconocían moléculas con peso molecular semejante, dependientes de calcio y sensibles a tripsina sólo que presentaban especificidad a diferentes tejidos, lo que sugirió que se trataba de moléculas diferentes (Takeichi 1988).

3.3. Clasificación

Los miembros que integran a la familia de cadherinas se clasifican en nueve grupos: 1. Cadherinas clásicas, 2. Cadherinas atípicas, 3. Transportadores de péptidos, 4. Cadherinas truncadas, 5. Protocadherinas, 6. Desmocolinas, 7. Desmogleínas, 8. Receptores de tirosincinasas y 9. Otras (Munro 1996).

La clasificación anterior es de acuerdo a ciertos criterios, como son:

- a) Localización en las uniones adherentes
- b) Dominios que integran su estructura
- c) Sitios altamente conservados de histidina, alanina y valina (HAV)
- d) Presencia de dominios de tirosín cinasa
- e) Número de residuos de aminoácidos en el dominio citoplásmico
- f) Sitios de fosforilación

Las moléculas de cadherina de nuestro interés se encuentran, de acuerdo a la clasificación anterior dentro del grupo de cadherinas clásicas.

3.4 ***Cadherinas clásicas***

Estructura

Las cadherinas clásicas comparten una estructura primaria similar que consta de 723 a 748 aminoácidos (a.a.) con una región altamente hidrofóbica, lo que sugiere que son glucoproteínas integrales de membrana (Takeichi 1988, Takeichi 1990, Takeichi 1991). Están constituidas por cinco dominios extracelulares (CAD), cada dominio contiene alrededor de 110 residuos y los dominios entre sí comparten un 30% de homología (Kemler 1993), lo cuál resulta de una duplicación parcial de genes, también poseen un dominio transmembranal integrado por 31 residuos de a.a. y dos dominios citoplásmicos. La estructura tridimensional de estos dominios ha sido elucidada recientemente (Overduin 1995, Shapiro 1995). El dominio 1 (CAD 1) contiene la secuencia histidina, alanina y valina (HAV) de reconocimiento de adhesión celular, involucrada en el proceso de adhesión mediado por cadherinas. Los a.a. adyacentes a este punto son esenciales para el reconocimiento de las cadherinas de una manera homofílica (Munro 1996), específicamente el residuo 113 es el que determina su

especificidad (Nose 1990). Con respecto a lo anterior hay estudios que demuestran que bajo ciertas circunstancias, las cadherinas tienen capacidad para formar complejos heterotípicos, la afinidad de adhesión de los complejos heterotípicos entre cadherinas diferentes es bajo con respecto a los complejos formados de una manera homotípica (Geiger 1992).

Los dominios 2 a 4 (CAD 2 a CAD 4) contienen puntos de unión a calcio LDRE, DXNDN y DXD (L-leucina, D-ac.aspártico, R-arginina, E-ac.glutámico y N-asparagina siendo X cualquier a.a.) en posiciones conservadas (Ozawa 1990a, Bracke 1996). El calcio es condicionante para el funcionamiento de las cadherinas ya que le confiere adhesividad, estabilidad y conformación, y a su vez posee un efecto protector contra la degradación proteolítica (Kemler 1993). El dominio extracelular adyacente a la membrana plasmática (CAD 5) contiene 4 residuos de cisteína en posiciones conservadas.

En la parte citoplásmica se encuentra una región altamente conservada común entre los miembros de la familia de cadherinas (Ozawa 1990b). La región de 20 kD de la parte citoplásmica posee sitios de forforilación de serina y treonina y contiene un fragmento de 72 residuos que funciona como sitio de reconocimiento para las cateninas, con las cuáles se conectan al citoesqueleto, esta región recientemente se ha reducido a 30 a.a. , que contienen 8 residuos de serina en posiciones conservadas (Bracke 1996).

Uniones adherentes

Las cadherinas integran y regulan el ensamblaje de las uniones adherentes o zonas adherentes que se sitúan entre célula y célula, del tejido epitelial y tejido cardíaco (cardiomiocito). En microscopía electrónica, estas uniones se observan como membranas plasmáticas adyacentes, con la presencia de una densidad electrónica en la cara intracelular de las células en contacto (Knudsen 1995). Las uniones adherentes son regiones especializadas de la membrana plasmática en

donde la molécula E-cadherina de las células en contacto, interactúan entre sí propiciando un fenómeno de adhesividad entre las células (Birchmeier 1996). A su vez, las cadherinas promueven la formación de otras uniones intercelulares (Munro 1996, Lampugnani 1997).

El primer paso en el ensamblaje de las uniones adherentes es la interacción de los dominios extracelulares de las cadherinas de una célula con los dominios extracelulares de las cadherinas de las células vecinas. Estos dominios extracelulares se asocian unos a otros y su unión es estabilizada por calcio que se localiza en la interface de dichos dominios. Las interacciones laterales entre las cadherinas conducen a la formación de un dímero, que a su vez se asocia con otros dímeros presentes en las células adyacentes de una manera antiparalela. Se ha propuesto que las interacciones entre estos dímeros de cadherinas generan una estructura en forma de "cierre" (zipper) cuya fuerza depende del número de moléculas de cadherina involucradas en esta estructura (Klymkowsky 1995, Gumbiner 1996).

3.5 Complejo cadherinas-cateninas y p120^{cas}

Los dominios citoplásmicos de las cadherinas son regiones altamente conservadas y están asociados con 3 proteínas intracelulares que, de acuerdo a su movimiento electroforético, se han designado como α , β y γ catenina (Takeichi 1993, Grunwald 1993, Kemler 1993, Hinck 1994), conformándose así un complejo cadherina-catenina. Existe evidencia de la presencia de dos complejos de E-cadherina/catenina distintos en la misma célula, uno de ellos integrado por E-cadherina / α y β catenina y el otro constituido por E-cadherina/ α y γ catenina (plakoglobina) (Hinck 1994, Butz 1994, Aberle 1996).

El ensamblaje de cualquiera de estos complejos une a las cadherinas con la red de filamentos de actina y a otras proteínas citoplasmáticas y

transmembranales (Kemler 1993). La conformación de este complejo es condicionante para el funcionamiento adecuado de las cadherinas (Ozawa 1990b, Gumbiner 1993), ya que en la ausencia de cateninas, las uniones adherentes no se forman, lo que conduce a un defecto en la adhesión celular del epitelio. Este desorden propicia una disociación de las capas epiteliales, un cambio en la morfología celular y un incremento en la motilidad de estas células (Birchmeier 1995, Birchmeier 1996); consecuentemente las células adquieren características de células del mesénquima.

Una pérdida controlada del carácter epitelial de las células es un prerrequisito en los procesos morfogénicos durante la embriogénesis y ocurren durante la formación del mesodermo. Una conversión epitelio-mesénquima incontrolada se observa durante la progresión de tumores humanos (Birchmeier 1996). Esta pérdida de diferenciación epitelial y la adquisición de características mesenquimales, favorecen la motilidad celular y esto se correlaciona con la invasividad de las células cancerosas.

De manera concreta, la formación del complejo cadherina-catenina en el citoplasma regula de alguna manera la adhesividad extracelular y se ha demostrado que las cateninas están involucradas en 2 eventos celulares importantes: 1) median la conexión de las cadherinas con la red de filamentos de actina (Ozawa 1990b, Kemler 1993, Gumbiner 1993, Bracke 1996) y 2) unen a las cadherinas con otras proteínas transmembranales como Na/K ATPasa y con proteínas periféricas del citoplasma como fodrina, ankirina, vinculina y talina (Bracke 1996).

Actualmente se ha visto que están involucradas en procesos de transducción de señales; existe evidencia de que las cadherinas no solo regulan los procesos de adhesión sino que además están involucradas en la regulación de procesos celulares como la migración, proliferación, apoptosis y diferenciación celular (Barth 1997).

Cateninas: características estructurales

Las cateninas provienen de una familia de multigenes y poseen estructuras altamente conservadas, que funcionan en organismos vertebrados e invertebrados (Kemler 1993, Grunwald 1993). Inicialmente se identificaron como un conjunto de 3 polipéptidos (α , β y γ catenina) asociados con la E-cadherina presente en los extractos de las células epiteliales Madin-Darby canine kidney (MDCK) que coinmunoprecipitaban con detergentes no iónicos como el tritón (TX-100) y posteriormente eran detectados por ensayos de inmunoblot. Estas proteínas citoplásmicas se unen a las cadherinas de una manera no covalente, en el dominio citoplásmico altamente conservado de las cadherinas, formando así complejos estables (Ozawa 1990b, Bracke 1996, Hinck 1994).

Las cateninas son miembros de la familia *armadillo*, que incluye a la proteína armadillo en *Drosophila*, y a la β -catenina, plakoglobina (γ -catenina) y p120^{cas} en vertebrados. La proteína *armadillo*, β -catenina y plakoglobina se unen directamente a las cadherinas mientras que la γ -catenina no; a su vez éstas se unen a los filamentos de actina intracelulares (Barth 1997).

Alfa-catenina (102 kD): El gen α -catenina humano se ha asignado al cromosoma 5q31 (Furukawa 1994). La estructura primaria de la proteína ha sido elucidada independientemente por dos grupos diferentes (Nagafuchi 1991, Herrenknecht 1991). La α -catenina es 30% homóloga a la vinculina, una proteína de 130 kD que se localiza en las uniones adherentes y se une con alta afinidad a talina. La molécula vinculina está a su vez involucrada con la familia de las integrinas (receptores de adhesión de matriz extracelular). La homología entre α -catenina y vinculina se restringe a 3 regiones: amino terminal, central y la región carboxiterminal. Se ha reportado que estas regiones de la vinculina tienen las siguientes funciones biológicas: interactúan con talina, se une a actina y homodimerizan; consecuentemente y dada la homología estructural entre ambas

moléculas, estas funciones biológicas se atribuyen también a la α -catenina. Se ha demostrado que α -catenina es esencial para la unión de las cadherinas a los filamentos de actina. Las similitudes estructurales entre ambas moléculas sugieren que la α -catenina es una proteína de unión a actina.

De manera análoga, la vinculina comparte con la α -catenina una secuencia peptídica que media la interacción con talina; consecuentemente se considera a la α -catenina como una proteína talina-relacionada. La α -catenina también se encuentra en células que no expresan cadherinas, en ellas, la α -catenina se encuentra en el citoplasma y puede poseer otras funciones biológicas aún no determinadas. La α -catenina se encuentra asociada a todas las cadherinas. Se ha demostrado que una isoforma de α -catenina se asocia con N-cadherina en células neurales (α N-catenina), mientras que la N-cadherina puede asociarse con α N-catenina o α E-catenina (Kemler 1993).

Beta catenina (88, 92 o 94 kD). El gen humano de β -catenina está localizado en el cromosoma 3p21 (Kraus 1994). Se ha demostrado que la β -catenina se asocia primero con el "polipéptido precursor" de las cadherinas, probablemente en el retículo endoplásmico, mientras que α y γ catenina se acoplan posteriormente al complejo. Por medio de análisis bioquímico se ha demostrado que la β -catenina interactúa directamente con la región citoplásmica de las cadherinas. Estudios de clonación y secuenciación de a.a. han revelado 63% de homología con la plakoglobina humana (Mc Crea 1991) y 70% de identidad con el producto del gen *armadillo* de *Drosophila* (miembro de la clase de genes *wingless*). La β -catenina, plakoglobina y la proteína armadillo son moléculas distintas que coexisten en el mismo tipo celular (Peifer 1992). La colocalización de β -catenina y plakoglobina en el mismo compartimento subcelular y sus semejanzas estructurales sugieren que estas dos proteínas pueden interactuar directamente con el dominio citoplásmico de las cadherinas.

Gamma-catenina (80, 83 ó 86 kD). Estudios bioquímicos del complejo cadherina-catenina indican que la γ -catenina se localiza en la periferia del complejo. Por medio de estudios de secuenciación de a.a. se ha sugerido que existen similitudes de esta molécula con la β -catenina; la homología de la β -catenina con la plakoglobina y el hecho de que la γ -catenina posee el mismo patrón electroforético que la plakoglobina, conducen al hecho de que la γ -catenina es idéntica a la plakoglobina.

Actualmente se ha visto que las moléculas de cadherina además de interactuar con las cateninas y regular procesos de adhesión están involucradas, y de alguna manera interactúan, con otras moléculas regulando otros procesos: La molécula p120^{cas} se une directamente a los complejos E-cadherina-plakoglobina; esta molécula es un sustrato de Src, molécula que pertenece a las tirosin cinasas, y puede ser fosforilada en respuesta a la estimulación de su ligando (Reynolds 1994, Barth 1997).

La molécula adenomatous polyposis coli (APC) es una proteína citoplásmica con un PM de 310 kD que posee varios dominios para interactuar con otras proteínas, la β -catenina y la plakoglobina también forman complejos con la APC que se sabe es producto de un gen supresor. Las cadherinas y la proteína APC compiten por los sitios de unión de las cateninas y forman a su vez complejos independientes que regulan procesos diversos con estas moléculas y están involucradas en procesos de transducción de señales (Barth 1997).

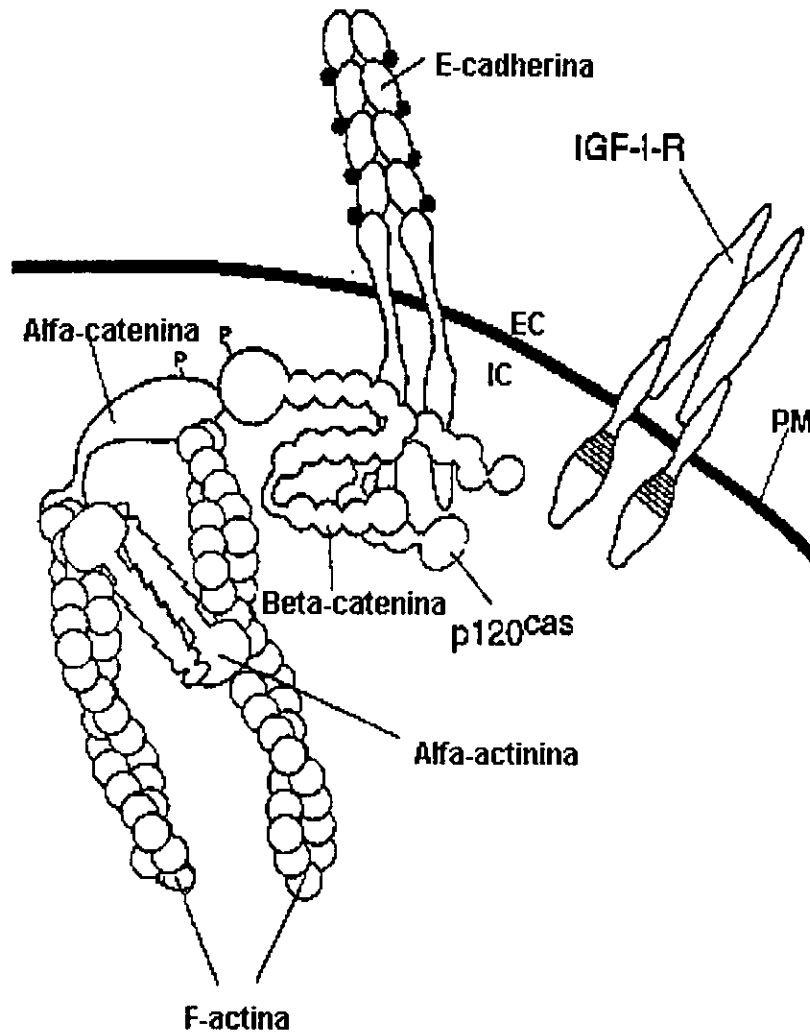


Figura 1. Representación esquemática del complejo E-cadherina-cateninas y su relación con el citoesqueleto. EC extracelular, PM membrana plasmática, IC intracelular (Mareel 1996).

4. DISTRIBUCION DE LAS CADHERINAS EN TEJIDOS

4.1 *Expresión de las cadherinas clásicas en tejidos*

Una gran variedad de tipos celulares expresan cadherinas que promueven su adhesión celular. La letra prefijo que se utiliza para nombrar a las cadherinas clásicas frecuentemente se refiere al tejido u órgano en el cuál la molécula se expresa. La E-cadherina (Cell-CAM120/80 en humano, Uvomorulina en ratón, Arc-1 en perro, L-CAM en pollo; $PM \approx 124$ kD) se expresa fundamentalmente en células epiteliales polarizadas (Takeichi 1988). La N-cadherina (A-CAM, N-Cal-CAM; $PM \approx 130$ kD) se expresa en tejido neural, cardiomiocitos maduros e inmaduros, músculo esquelético y pulmón (Knudsen 1990, Radice 1997) y se ha visto que juega un papel importante en la interacción de miocitos (célula del tejido cardíaco) y la miofibrinogénesis (Soler 1995), la N-cadherina conjuntamente con otras moléculas de adhesión se expresan en tejido nervioso y durante el desarrollo del músculo esquelético, y se expresa también en fibroblastos de pollo. La P-cadherina ($PM \approx 118$ kD) se expresa en una línea celular de fibroblastos de rata , en placenta de ratón y en ciertas regiones restringidas del epitelio humano como la epidermis, mesotelio y epitelio corneal (Geiger 1992, Takeichi 1988); a su vez un tipo de cadherina puede expresarse en diferentes tejidos y un mismo tejido puede expresar varias cadherinas, principalmente en la embriogénesis (Grunwald 1993, Munro 1996, Takeichi 1988).

Por estudios de mapeo, se han localizado los genes de la E, y P-cadherina en el cromosoma 8 de ratón y en el cromosoma 16 para el humano. El gen para la N-cadherina se ha asignado al cromosoma 18 en ambos, humano y ratón (Grunwald 1993, Bracke 1996).

4.2 *Expresión de cadherinas durante la morfogénesis del tejido pulmonar*

El desarrollo embrionario involucra un proceso denominado patrón de formación en el cuál se establece la velocidad de desarrollo que regirá a las células y por consiguiente al embrión. Este proceso involucra un evento de inducción primaria que ocurre en la etapas tempranas del desarrollo y es el causante de que se generen las tres capas germinales: el ectodermo, mesodermo y endodermo; posteriormente, sigue una inducción secundaria que involucra las interacciones epitelio-mesénquima que controlan la proliferación celular y la diferenciación del órgano y tejido durante el desarrollo.

Es precisamente en estas interacciones epitelio-mesénquima en donde se encuentran involucrados componentes de la matriz extracelular (ECM), como las citocinas, receptores de adhesión célula-célula (cadherinas entre otros) y receptores de célula-ECM.

Durante el desarrollo pulmonar son necesarias estas interacciones epitelio-mesénquima, ya que primordialmente se presenta crecimiento y ramificación del epitelio respiratorio primitivo (túbulo endodermal) y después se forma el árbol bronquial. Este proceso se conoce cómo morfogénesis ramificante y es considerado como el período de interacciones epitelio-mesénquima más activo.

Posterior a la morfogénesis ramificante, se conduce a una diferenciación celular que involucra la aparición de células epiteliales, con las cuáles se forma la porción bronquial de todo el pulmón y la aparición de las células cuboidales que forman los sacos terminales.

Como mencioné anteriormente, durante la morfogénesis, desarrollo y diferenciación del sistema respiratorio se llevan a cabo interacciones complejas entre las células y sus productos como: citocinas, componentes de la ECM y receptores de superficie celular. Cada uno de estos componentes interacciona con otro(s) o entre sí mismo para producir un efecto fisiológico y dentro de los receptores de adhesión principalmente involucrados en el desarrollo pulmonar se

encuentran las integrinas, cadherinas y otros receptores de adhesión celular como la epimorfina (Mino 1994).

Las cadherinas que se encuentran involucradas en el proceso morfogénico del pulmón son la E- y P-cadherina y se han realizado muy pocos estudios con el uso de anticuerpos monoclonales para determinar su distribución en el epitelio pulmonar; la expresión de E- y P-cadherina se ha detectado en todas las células epiteliales del pulmón humano y específicamente, la molécula de E-cadherina se ha sugerido que se encuentra distribuída en las "uniones adherentes" de las células epiteliales de pulmón tanto en adultos como en embriones, mientras que la distribución de la molécula P-cadherina se encuentra tanto en células epiteliales y no epiteliales; y se expresa primero en el epitelio rudimentario y posteriormente en la parte distal del árbol bronquial. Otros estudios han reportado una expresión transitoria de N-cadherina en el desarrollo del epitelio pulmonar de embriones de pollo (Hatta 1987).

Durante el desarrollo pulmonar, la expresión de P-cadherina se encuentra regulada temporalmente, en contraste con la expresión de la E-cadherina que se expresa constantemente en el epitelio pulmonar. Anticuerpos dirigidos en contra de la E- y la P-cadherina en cultivo inducen una morfogénesis anormal del epitelio que se traduce como una deformación de los lóbulos y túbulos pulmonares (Hirai 1989). El efecto de inhibición de la morfogénesis producido por anticuerpos anti-E-cadherina conduce a anormalidades más dramáticas que la inhibición producida con anti-P-cadherina. La inhibición de ambas moléculas causa un efecto sinérgico, en este caso el rearrreglo de las células epiteliales se ve afectado y la ramificación del epitelio no se lleva a cabo. Estos estudios sugieren que existe una comunicación celular mediada por cadherinas en las uniones intercelulares que regulan el proceso morfogénico de las células epiteliales de pulmón (Mino 1994).

ANTECEDENTES

5. CANCER

5.1 *Oncogenes y genes supresores*

Las células normales están mediadas por señales externas e internas que les indican cuando deben proliferar o cuando deben dejar de hacerlo. La capacidad para ignorar estas señales constituye una propiedad fundamental de la célula neoplásica. El cáncer parece ser el resultado de la acumulación de alteraciones a nivel genético que afectan prácticamente a todo el proceso de regulación y proliferación celular. Los tumores malignos del ser humano constituyen expansiones clonales de células con alteraciones genéticas adquiridas que persisten a través de muchas divisiones celulares y que dan lugar a alteraciones genéticas todavía mayores con progresión de malignidad. En algunos tumores, las alteraciones genéticas producen la expresión excesiva de protooncogenes. Estos están localizados en sitios del genoma humano y son los responsables de la elaboración de proteínas que favorecen los procesos de proliferación celular. Las células también contienen antioncogenes o genes supresores, que inhiben la proliferación celular.

En el caso más sencillo, la activación de un gen que favorece la proliferación implica la sustitución de un único nucleótido, produciendo la alteración del material genético, con la consiguiente desregulación de la división celular. Esta alteración en únicamente una copia del gen que, dará lugar a su activación y por tanto, a su comportamiento dominante (oncogen).

Por el contrario, la pérdida completa de la función de los genes supresores se produce nada más cuando ambas copias paterna y materna están lesionadas (Weinberg 1996).

Existen muchos factores endógenos y exógenos que pueden producir alteraciones genéticas que de alguna manera conducen a una proliferación desordenada. Por ejemplo, la luz ultravioleta puede producir alteraciones genéticas que conducen a mutaciones a nivel molecular las que de alguna manera favorecen el desarrollo del cáncer cutáneo. La metilación de la citosina del DNA en los dinucleótidos de CG (citosina y guanina) parece incrementar la frecuencia de desaminación espontánea, ocasionando una mala lectura y la sustitución de la C por T (timina); esta alteración es especialmente frecuente en los carcinomas de colón y mama. La alquilación por nitrosaminas o benzopirenos ambientales, especialmente en el humo de los cigarrillos, da lugar a las sustituciones de la G por A (adenina) y de G por T. El riesgo en los carcinomas se ha relacionado con diversos factores dietéticos, aunque no se conoce el mecanismo a través del cual están relacionados el incremento en el riesgo y las alteraciones genéticas en el desarrollo de carcinomas. Sin embargo, los carcinógenos específicos que producen la mayor parte de los tumores malignos del ser humano siguen siendo desconocidos, al tiempo que sabemos muy poco sobre el mecanismo exacto con el que actúan sobre el DNA, la distribución tisular de estos efectos y los genes con carácter crítico (Weinberg 1996).

5.2 Capacidad invasiva del cáncer y metástasis

Para que las células neoplásicas se liberen del tumor primario y den lugar a tumores secundarios, deben ser capaces de alcanzar los tejidos adyacentes, atravesar las paredes vasculares y viajar a otras zonas, en donde estas células se detienen y crecen. Aunque un gran número de las células del tumor primario pueden introducirse en la circulación, únicamente un 0.01% sobrevive y da lugar a tumores secundarios. No obstante, como las células de los tumores tienen capacidad para producir metástasis, el volumen del tejido tumoral del paciente puede incrementarse en forma exponencial. Las células neoplásicas tienden a

diseminarse a través de todo el organismo, especialmente en órganos como el pulmón, el cerebro, el hígado y la médula ósea. La capacidad de metástasis y su heterogeneidad biológica constituyen los obstáculos principales para su erradicación.

La capacidad metastásica que pueden tener las células tumorales depende de varios factores, como la angiogénesis y la adhesión celular entre otros; las células tumorales deben tener capacidad invasiva para poder generar metástasis y para ello requieren llevar a cabo los siguientes procesos: perder los mecanismos de adhesión, romper la membrana basal por mecanismos de digestión proteolítica y migrar. Las células invasivas deben crecer para posteriormente formar metástasis en sitios alejados del tejido primario del cual partieron.

Las metástasis requieren una motilidad celular activa no sólo en las células endoteliales para el proceso de la angiogénesis sino también en las propias células tumorales. La migración se inicia por la pérdida de mecanismos de adhesión en donde se ven involucradas las moléculas de adhesión; además de la formación de pseudópodos, seguida por el proceso de traslocación de toda la célula. La locomoción de la célula tumoral se realiza a través del ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina y otros componentes del citoesqueleto (Kim 1994, Koukoulis 1998).

5.3 *Cáncer pulmonar*

El cáncer de pulmón es un tumor de características exclusivas puesto que en la mayoría de los casos se asocian con un único y complejo factor ambiental, el humo del tabaco. Otros contaminantes inhalados, como el asbesto y radón así como diversos factores genéticos, también incrementan el riesgo de cáncer de pulmón, especialmente cuando se combinan con el consumo de cigarrillos. Cada aspiración hace que los pulmones queden expuestos al ambiente. De esta forma, las vías respiratorias representan una vía de acceso de compuestos adictivos o

psicoactivos desde el ambiente hacia el torrente sanguíneo. Uno de estos compuestos de carácter adictivo es la nicotina que puede ser convertida en potentes carcinógenos de tipo nitrosamina durante la inhalación y degradación del humo del tabaco.

Las nitrosaminas derivadas de la nicotina constituyen carcinógenos potentes y específicos. Pequeñas dosis de nitrosaminacetona derivada de la nicotina, administrada por vía subcutánea, oral o tópica, causa la aparición predominante de tumores pulmonares en animales de experimentación. Otro tipo de carcinógenos que existen en el humo del tabaco son los hidrocarburos policíclicos como el benzopireno, que se ha visto que también lesionan de forma directa al DNA (Netter 1989).

Los tumores broncopulmonares se clasifican en tumores primarios y secundarios; de los primarios se encuentra el carcinoma broncopulmonar y los llamados tumores benignos broncopulmonares y los secundarios o metastásicos que a partir de un tumor primario conducen a la aparición de otro alojado en cualquier lugar del organismo.

El carcinoma broncopulmonar representa el 90% de todos los tumores pulmonares y por su origen bronquial se le designa también con el nombre de carcinoma broncogénico o bronquial (Varela 1996).

En México el cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en 1990 según la Dirección General de Epidemiología y con respecto a los cánceres malignos, el cáncer de pulmón presenta un índice de 6.1 por 100 000, seguido por los tumores de estómago con un índice de 5.0 por 100 000 y el carcinoma cervico uterino con un índice de 4.9 por 100 000 (SSA Dirección Nacional de Epidemiología, Registro Nacional de Tumores. Ciudad de México, 1989).

De acuerdo a datos recientes y con respecto a un estudio retrospectivo de los índices de mortalidad que se presentaron en México durante los años de 1979-1993 se observó que en los años estudiados de las 73 807 defunciones se

presentaba un aumento en el índice de mortalidad de 5.01-7.25 por 100 000 habitantes con respecto a estudios previos. La mortalidad en los pacientes aumenta con respecto a la edad (60 años) en ambos sexos. Los riesgos de mortalidad en los individuos son más altos en los estados del norte del país con respecto a los estados del sur, ésto se debe a que los estados del norte del país se encuentran industrialmente más desarrollados que los estados del sur. Otro dato importante que aporta este estudio es que el 70% de las defunciones se presentan en el sexo masculino, 2.7 veces más que en el sexo femenino y de éstas el 60% ocurre después de los 65 años de edad aunque no se descarta la posibilidad de encontrar pacientes jóvenes y con prevalencia de los adenocarcinomas pulmonares (Lazcano 1997).

5.3.1 *Histogénesis del cáncer pulmonar*

El pulmón se divide en dos partes: la conductiva y la respiratoria. El bronquio y los bronquiolos constituyen la parte conductiva, mientras que el alveolo constituye la parte respiratoria; los tumores se dividen a su vez en tumores centrales que son los que se originan en los bronquios y los tumores periféricos los cuáles se originan en los bronquiolos y/o alveolos (Gazdar 1994).

Clasificación histológica

La clasificación de la World Health Organization (WHO) divide al cáncer de pulmón en cuatro grandes categorías: epidermoide (células escamosas), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas. Existen también algunas formas combinadas como el carcinoma adenoescamoso que es relativamente común. En algunas ocasiones suelen presentarse componentes glandulares, de células pequeñas o escamosas en el mismo tumor, lo que sugiere que los carcinomas pulmonares comparten un origen endodérmico.

Carcinoma epidermoide o de células escamosas

El tumor se origina a partir del epitelio bronquial y se cree que representa el punto final de un proceso de cambio maligno gradual. Desde el punto de vista histológico, los carcinomas de células escamosas se reconocen por la presencia de puentes intercelulares, formación de nidos celulares, queratinización con la presencia de perlas córneas y espiralización de la población celular. La mayoría de los carcinomas epidermoides se encuentran en los bronquios centrales, no es sorprendente que los fenómenos obstructivos sean relativamente comunes. El diagnóstico del carcinoma epidermoide se basa en la demostración de los cambios histológicos típicos en el material de biopsia o en la citología de esputo. El tumor no tiende a metastatizar sólo hasta muy avanzada su evolución y, si se deja sin tratar, la supervivencia del paciente es más larga que en los demás carcinomas broncogénicos. En las lesiones periféricas, sin metástasis evidente, la extirpación quirúrgica causa un índice de supervivencia al cabo de 5 años superior al 50%. Sin embargo, una vez que se ha producido la metástasis, la resección quirúrgica total se vuelve más difícil y los índices de supervivencia descienden precipitadamente. Si el tumor no puede ser extirpado, entre el 0 y 5% de los pacientes estarán vivos 5 años después del diagnóstico. En este tipo de cáncer la intervención quirúrgica es mucho más satisfactoria que la quimioterapia que resulta ser decepcionante (Netter 1989).

Adenocarcinoma

Un aspecto peculiar del adenocarcinoma de pulmón es su frecuencia a aparecer en las regiones periféricas del parénquima pulmonar, lo cual tiene importantes consecuencias para la sintomatología, diagnóstico y terapia. La configuración glandular y la producción de mucina son las características que distinguen histológicamente el adenocarcinoma de otros tipos de carcinomas

broncogénicos. La estructura de las glándulas puede ser típicamente acinar, con mucina llenando su interior, o bien papilar, que consiste en células cilíndricas o cuboidales encajadas dentro de unas proyecciones irregulares en forma de dedo. La mucina puede estar en localización extra o intracelular. Para establecer el diagnóstico de adenocarcinoma hay que encontrar al menos uno de estos criterios histológicos. Dado que la mayoría de los crecimientos primarios aparecen lejos de las vías aéreas grandes, son raros los síntomas obstructivos y el tumor tiende a ser clínicamente silencioso. Con frecuencia, en un examen radiológico habitual de tórax se encuentra una masa. Cuando finalmente aparecen los síntomas, éstos incluyen: tos, hemoptisis, dolor torácico y pérdida de peso. Desde el punto de vista radiológico, la presentación más común es un nódulo pulmonar periférico solitario, cercano a la superficie pleural y a menudo con un tamaño inferior a 4 cm. El tercio restante de adenocarcinomas se origina en un bronquio central y puede producir los mismos signos y síntomas que se observan en otros cánceres de pulmón. La resección es posible en una elevada proporción de casos pero el índice de supervivencia a los 5 años es aún inferior al 10%. Esto se debe a que las metástasis aparecen bastante precozmente en el curso de la enfermedad, aunque no tanto como en el carcinoma de células pequeñas. El descubrimiento de ganglios linfáticos positivos en la muestra quirúrgica indica un mal pronóstico para la supervivencia a largo plazo. Ni la radioterapia, ni los regímenes quimioterapéuticos han logrado aumentar el índice de supervivencia a 5 años más allá del 5 al 10% de los pacientes afectados (Netter 1989).

Carcinoma de células grandes

Este tipo de tumor broncogénico primario se diagnostica por exclusión con respecto a las características de los otros tipos de tumores; es decir, si no se presentan los hallazgos histológicos del carcinoma de células escamosas o del adenocarcinoma, el tumor se definirá como anaplásico y, si en general las células

son mayores que los leucocitos, se establecerá el diagnóstico de carcinoma de células grandes. Estas células son pleomórficas y contienen núcleos grandes de tinción obscura con nucleólos prominentes. Son comunes las mitosis y la variación del tamaño celular puede ir acompañada de una serie de formas celulares que van desde poligonal a la oval o fusiforme. También se han descrito las variedades del tumor con células gigantes y células "De clara".

En su presentación clínica o radiológica no hay ninguna característica que lo distinga de otros tumores pulmonares malignos, excepto que se presenta una moderada tendencia a que en el examen radiológico se observa una lesión grande localizada periféricamente. Mientras que en los adenocarcinomas periféricos las lesiones son de un diámetro inferior a 4 cm en el momento del diagnóstico, en general en los carcinomas anaplásicos de células grandes las lesiones que se presentan son mayores. Puede presentarse también lesiones localizadas centralmente.

Las lesiones periféricas son silenciosas durante períodos más largos que las lesiones centrales, aunque pueden afectar la pared torácica y causar dolor y derrames pleurales. Sin embargo, como norma el tumor causa tos, producción de esputos, hemoptisis y cuando se encuentra en una vía aérea principal, neumonía obstructiva.

Basados tanto en los criterios histológicos como en la observación clínica, se considera que estos tumores son extremadamente malignos. Ni la radioterapia ni la quimioterapia han resultado útiles para prolongar la vida (Netter 1989).

Carcinoma de células pequeñas

De los tumores broncogénicos, el carcinoma de células pequeñas es el más agresivo y se caracteriza por presentar células de 6 a 8 μ m de diámetro, una proporción nucleo-citoplasma extremadamente elevada y un hiper cromatismo de los núcleos, en ocasiones las células se confunden con leucocitos, a los que se

parecen estrechamente. Cuando casi no hay citoplasma y las células están comprimidas en forma ovoide, la neoplasia se denomina *carcinoma de células en avena*. Estudios recientes sugieren que estos carcinomas derivan de un precursor embriológico de cresta neural. Esta observación correlaciona por la presencia de gránulos neurosecretorios dentro de las células.

Los tumores anaplásicos de células pequeñas producen síntomas similares a los que se ven en otros carcinomas broncogénicos. El síntoma que se presenta con más frecuencia es la tos, puede también presentarse dolor torácico, disnea, y sibilancias. El origen de este tipo de tumores predomina en los grandes bronquios, no es raro observar en el exámen radiológico masas hiliares o perihiliares. Para su diagnóstico, se sugiere confirmar con estudios histológicos y citológicos y en la mayoría de los casos se puede efectuar una broncoscopia, debido a la posición central de la mayoría de los tumores de células pequeñas.

El tiempo medio de supervivencia para los pacientes con un carcinoma pulmonar de células pequeñas no tratado es de 7 semanas después del diagnóstico y la muerte es debida por lo general a la enfermedad metastásica (Netter 1989).

5.4 Cáncer de pulmón en México

En nuestro país la incidencia de los tumores primarios de pulmón de acuerdo a su clasificación histológica y apoyados en un estudio reciente realizado en el Instituto Nacional de Emfermedades Respiratorias (INER) en donde se estudiaron 1019 pacientes por un período de 9 años, se presentaron los siguientes hallazgos: 636 casos fueron hombres y 383 mujeres, el intervalo de edad con mayor número de casos fué de 61-70 años.

El análisis histopatológico mostró un alto porcentaje de tumores de tipo adenocarcinoma (47.2%), seguido de los carcinomas epidermoides (37.3%), los tumores de células pequeñas presentaron sólo un 10.3%. Otras variedades combinadas e incluyendo al tumor de células grandes sólo se observó en un pequeño porcentaje. Con respecto al sexo, el adenocarcinoma presentó el mayor número de casos en mujeres (54%) que en hombres (43%) y en el cáncer epidermoide la mayoría fueron hombres (42.1% vs 29.2%), el tumor de células pequeñas presentó muy poca diferencia pero predominó en el sexo femenino (9.8% vs 10.7%) y en los otros tipos histológicos incluyendo el de células grandes esta relación fué poco significativa ya que la incidencia en mujeres con respecto a los hombres fué de 6% vs 5%. Una cuestión que es importante mencionar es que del total de estos casos, el 66.7% son fumadores con un alto porcentaje en los hombres con respecto a las mujeres (85.8% vs 34.9%) (Medina 1996, Lazcano 1997).

6. FUNCION E IMPORTANCIA BIOLOGICA DE LAS E- y N-CADHERINAS

6.1 *Función organizadora y supresora de la E-cadherina*

La E-cadherina modula el proceso involucrado en el reconocimiento y adhesión celular, además de inducir la polarización celular. La polaridad de las células epiteliales implica que la distribución de las células en un tejido esta restringida a ciertas regiones de la membrana plasmática; la polaridad celular es condicionante para la función del epitelio, como es el transporte de fluidos de una manera vectorial, como es el caso de la distribución de sodio, potasio, adenosintrifosfato y el receptor del factor de crecimiento epidermal (Munro 1996). La formación e integridad funcional tanto de las uniones adherentes, las uniones tight; uniones gap y desmosomas presentes en las células epiteliales son reguladas por medio de la E-cadherina, ZO-1, conexina 43 y desmoplakina respectivamente (Bracke 1996).

Un hecho relevante es que la E-cadherina además de ser responsable de la polaridad celular del epitelio, esta involucrada en la diferenciación glandular y estratificación epidérmica, considerándose por lo tanto como una molécula organizadora (Bracke 1996).

Recientemente se le ha atribuido a la E-cadherina el papel de gen supresor ya que se ha observado que en líneas celulares altamente invasivas cuando se transfectan con el gen para la E-cadherina, éstas pierden su capacidad invasiva, por otro lado en experimentos inmunohistoquímicos se ha observado que en los carcinomas gástricos se presenta una mutación puntual en el gen 16q22.1 que es en donde se encuentra la E-cadherina, este tipo de mutaciones son silenciosas y dan evidencia *in vivo* de que las alteraciones en la E-cadherina juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de este tipo particular de cáncer (Pignatelli 1993, Birchmeier 1995).

6.2 *Función de la N-cadherina durante el desarrollo neural y la miofibrinogénesis*

La expresión de las cadherinas durante la embriogénesis se ha visto que se encuentra regulada en los aspectos de espacio y tiempo, es decir la expresión de las cadherinas está coordinada con la desaparición de la E-cadherina en las células del ectodermo y la aparición de la N-cadherina durante la diferenciación de las células hacia el mesodermo. En la diferenciación del mesodermo hacia varios tejidos, la expresión de la N-cadherina cambia dinámicamente, algunas células mantienen la expresión y otras células la pierden. Durante este proceso de diferenciación, la expresión de la N-cadherina aparece en el tubo neural en donde esta cadherina se encuentra en mayor proporción.

En la etapa de diferenciación del sistema nervioso central (SNC) la expresión de la N-cadherina se presenta, de manera variable en las diferentes regiones, es decir, en algunos tejidos como en el cerebelo se observa una distribución de la N-cadherina aún en el tejido maduro pero restringida a ciertas regiones; sin embargo, en la retina neural y el nervio óptico la expresión de la N-cadherina sólo se expresa en los estadios tempranos y se va perdiendo a manera que el tejido se va diferenciando y su expresión se restringe sólo a la membrana limitante (Takeichi 1988).

Con respecto a la función de la molécula de N-cadherina en la miofibrinogénesis, existe evidencia de la participación de ésta en la formación de miotúbulos y su papel en la adhesión de las células del tejido cardíaco. El proceso de miogénesis involucra mecanismos de reconocimiento y adhesión celular dependientes de calcio, en donde la molécula N-cadherina y A-CAM están directamente involucradas. Por medio de estudios de inmunoblot se identificó que ambas moléculas mostraban una banda de peso molecular similar, concluyéndose que se trataba de la misma molécula aunque originalmente la molécula A-CAM se

identificó en músculo cardíaco y la N-cadherina se identificó en cerebro (Knudsen 1990).

7. CADHERINAS EN CANCER

7.1 Adhesión celular en tumores

Los tumores, comparados con tejido normal muestran irregularidades como son: desdiferenciación, pérdida de la arquitectura y, si son malignos presentan características invasivas.

En los tejidos altamente organizados estas funciones se controlan por señales mediadas por factores solubles (ej. hormonas y factores de crecimiento) ó por factores insolubles (ej. moléculas de adhesión). Las células tumorales han perdido la capacidad de responder normalmente a las señales reguladoras de crecimiento que son inducidas por las interacciones célula-célula y célula-ECM, en las que participan diferentes moléculas de adhesión; lo que conduce a un desorden en la adhesión de estas células y sugiere que las moléculas que controlan estos procesos son productos de genes supresores (Hedrick 1993). Se ha postulado que los cambios en las interacciones célula-célula y célula-ECM favorecen la capacidad de las células tumorales a invadir el tejido normal y migrar a sitios distantes y se sugiere que alteraciones en los mecanismos de adhesión son necesarios para que el tumor lleve a cabo los procesos de invasión y metástasis (Pignatelli 1994, Koukoulis 1998).

En estudios histológicos se ha observado que los carcinomas invasivos tienen reducida su diferenciación epitelial y las células adquieren características mesenquimatosas y mediante microscopía electrónica se muestran disminuidos sus desmosomas, por lo que se ha propuesto que las células malignas requieren de la disminución en la adhesión intercelular para adquirir una conducta invasiva.

Las células epiteliales con respecto a las células del mesénquima son morfológica y funcionalmente diferentes; las células epiteliales expresan uniones intercelulares, son polares y son inmóviles, mientras que las células mesenquimales están asociadas de una manera desordenada, no son polares y están rodeadas por una matriz extracelular. Los procesos de adhesión que rigen a estas células mesenquimales son mediados principalmente por SAMs mientras que en las células epiteliales los procesos de adhesión están principalmente regulados por CAMs (Hynes 1992, Birchmeier 1994).

La molécula que principalmente está involucrada en la pérdida de diferenciación de las células epiteliales y que la alteración en su expresión conduce a una pérdida de la adhesividad y se sugiere que favorece la invasividad de las células tumorales, es la E-cadherina (Birchmeier 1994).

7.2 Expresión de la E-cadherina en células tumorales

En condiciones normales, las células epiteliales tanto de ratón como de humano expresan de una manera estable moléculas de E-cadherina *in vivo*. Se ha confirmado que aún en estados de inflamación o en zonas adyacentes al tumor, los tejidos continúan expresando de una manera constante a la E-cadherina como principal molécula de adhesión; esto sugiere que la expresión de la E-cadherina no está influenciada por el microambiente celular (Shiozaky 1991, Shiozaky 1996).

Los tumores están constituidos por una población heterogénea de células, consecuentemente la expresión de cadherinas es irregular, es decir, muestran un patrón de expresión variable (Munro 1996). Se ha visto que un 68% de los tumores con expresión reducida de E-cadherina muestran un patrón de expresión anormal en las estructuras celulares del tumor *in vivo*; ya que pueden presentar una localización de la E-cadherina en el citoplasma celular; este acontecimiento sugiere que existen desórdenes estructurales y funcionales de las moléculas de E-cadherina en células tumorales (Shiozaky 1991).

7.3 *E-cadherina como molécula supresora de la invasión*

En tumores humanos, el estudio de la pérdida de alelos se usa para identificar a genes supresores tumorales. Recientemente, se ha detectado que la pérdida del alelo (LOH) del brazo largo del cromosoma 16 se manifiesta en varios tumores; en el caso de carcinoma hepatocelular, la pérdida de este alelo (LOH) se localiza específicamente en el locus 16q22.1 que es el sitio del gen para la molécula E-cadherina y correlaciona con la progresión del tumor.

Las investigaciones atribuyen a la E-cadherina el papel de molécula supresora, este concepto proviene de dos tipos de estudios: 1) Estudios que correlacionan la baja expresión de la E-cadherina en tumores invasivos y 2) Regulación en la expresión de la E-cadherina que conduce a una inhibición e inducción de la invasión.

Con respecto a estos estudios, se ha concluido que existe una relación inversa entre la expresión de E-cadherina y la progresión de tumores malignos. Por medio de estudios inmunohistoquímicos e hibridaciones *in situ* en tejidos, se ha observado que la expresión reducida de la E-cadherina se correlaciona con los siguientes parámetros: fenómenos de progresión de tumor, pérdida de diferenciación, invasión, potencial metastásico y mal pronóstico (Bracke 1996).

El patrón de expresión reducido de la E-cadherina se ha sugerido que puede ser consecuencia de una supresión, error en la transcripción o una mutación en el gen de ésta. Otro hallazgo importante que explica su disfunción es un desorden transduccional o pérdida alélica del gen 16q (Birchmeier 1995, Shiozaki 1996).

La expresión disminuída de E-cadherina se observa en tumores con características histopatológicas agresivas, que se definen por un grado morfológico invasivo e infiltramiento linfático (metástasis). La expresión reducida de la E-cadherina se observa más frecuentemente en tumores con metástasis que en aquellos con crecimiento invasivo (Shiozaki 1996, Bracke 1996).

Existen muy pocos y contradictorios estudios en relación a carcinomas pulmonares y en algunos se ha sugerido que en el adenocarcinoma pulmonar invasivo la expresión de la molécula E-cadherina se encuentra distribuida de manera homogénea, sin embargo otros estudios sugieren que existe correlación en la expresión y la diferenciación de los tumores pulmonares (Matsuura 1992, Bongiorno 1995, Soler 1995, Böhm 1994). El hecho de que ésta se exprese en tumores invasivos sugiere que bajo ciertas circunstancias la E-cadherina no es suficientemente activa como supresora de la invasión, alternativamente otra razón que explica la disfunción de la E-cadherina es la baja expresión de la α -catenina lo que conduce a un mal ensamblaje del complejo cadherina-catenina como es el caso de cáncer de esófago, estómago, colón y mama. Otra razón puede ser una delección en el residuo 107 de a.a. del amino terminal de la β -catenina, la β -catenina mutada interactúa con la E-cadherina pero no con la α -catenina impidiendo de esta manera la conformación funcional del complejo cadherina-catenina (Shiozaki 1996).

Desde el punto de vista clínico existen moléculas que regulan la función de la E-cadherina siendo de gran valor para la terapia futura del cáncer, entre ellas se incluyen el factor de crecimiento parecido a insulina 1 (IGF-1), tangeretin y tamoxifén (Bracke 1996).

7.4 Expresión de la N-cadherina en células epiteliales normales y en células tumorales

En relación a la N-cadherina no existen estudios en cuanto a su expresión y distribución en epitelio normal. Con respecto a los diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar, sólo existe un reporte asociado a los adenocarcinomas (Soler 1995).

8. JUSTIFICACION

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias mas difíciles de tratar y desafortunadamente no hay una amplia variedad de tratamientos y el uso de la radioterapia y la quimioterapia son métodos paliativos y rara vez prolongan la vida del paciente. Se ha descrito que la molécula E-cadherina modula la adhesión intercelular de manera homofílica en los epitelios y que una alteración en su expresión conduce a procesos de invasión y metástasis, por lo que se ha sugerido que puede ser utilizado como un marcador de la agresividad mostrada por el tumor. Con respecto al cáncer de pulmón existen muy pocos estudios sobre la expresión de E-cadherina y éstos han arrojado resultados contradictorios, en relación a la N-cadherina no se han realizado estudios. Por lo cual, hemos decidido determinar la expresión de la E- y N-cadherina y correlacionar éstas con el grado de diferenciación expresado en los distintos tipos histológicos de cáncer pulmonar.

9. HIPOTESIS

Los diferentes tumores pulmonares que son de origen epitelial muestran una alteración en el patrón y grado de expresión de E-cadherina lo que correlaciona con el grado de diferenciación del tumor. Con respecto a los tumores de células pequeñas que se asocian con un origen neuroendócrino y muestran un comportamiento clínico altamente invasivo y metastásico preferentemente se asociarán con una mayor alteración en la expresión y distribución de la E- y N-cadherinas.

OBJETIVOS

10. OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón y el grado de expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas en los diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar y correlacionarlo con el tipo histológico, grado de diferenciación y potencial metastásico.

10.1 *Objetivos particulares*

1. Determinar el patrón y grado de expresión para la E-cadherina en el epitelio respiratorio bronquial y alveolar.
2. Determinar el patrón y grado de expresión para la N-cadherina en el epitelio respiratorio bronquial y alveolar.
3. Determinar la alteración en la expresión de la E-cadherina en biopsias y autopsias que provengan de los tipos histológicos de cáncer pulmonar más frecuentes en la población mexicana.
4. Determinar la alteración en la expresión de la N-cadherina en cortes histológicos de los tipos de cáncer pulmonar más frecuentes en la población mexicana.
5. Correlacionar la expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas empleando cortes seriados del tumor de un mismo sujeto.

MATERIAL Y METODOS

11. MATERIAL EMPLEADO EN EL METODO INMUNOHISTOQUIMICO

Especlmenes

Se emplearon cortes histológicos seriados de biopsias y autopsias de carcinomas pulmonares incluidas en parafina que representan a los distintos carcinomas pulmonares, los cortes tenían un grosor de 4-6 micras. Las muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Para este estudio, se utilizaron en total 85 casos distribuidos de la siguiente manera: 25 adenocarcinomas (ADCA), 21 casos de cáncer epidermoide, 11 casos de cáncer de células pequeñas, 12 casos de cáncer de células grandes, 16 casos de pulmón normal con zonas de epitelio bronquial y alveolar. En el caso de neoplasias, éstas se clasificaron de acuerdo a sus diferentes grados de diferenciación.

Anticuerpos

Anti E-cadherina (anticuerpo monoclonal IgG1 de rata, anti uvomorulina, clona DECMA-1) y Anti N-cadherina (anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón, anti-A cell Adhesion Molecule, Clona GC-4) ambos obtenidos de Sigma Chemical (St Louis, MO). Se emplearán como segundos anticuerpos: anticuerpo anti-rata biotinilado y el anti-ratón biotinilado respectivamente, obtenidos de DAKO Corp (Denmark). Como sistema amplificador de la reacción se empleó el complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (streptABComplex/HRP de DAKO Corp Denmark), el cual contiene un reactivo compuesto por biotina peroxidada y la

estreptoavidina. Como sistema revelador se utilizó peróxido de hidrógeno y 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB).

Inmunohistoquímica

Una etapa previa al procedimiento de inmunohistoquímica fué desparafinar e hidratar los cortes, éstos se sometieron a calor (horno 60°C) durante 5 minutos para desparafinar y posteriormente someterlos a baños de xilol, y diferentes grados de alcohol (etanol absoluto, 70%, 50%, 20%, por 5 min en cada baño) y finalmente en agua destilada, durante todo el proceso no se permitió que los cortes se secaran. Antes de iniciar el protocolo de inmunohistoquímica los cortes se mantuvieron en amortiguador de lavado HNC (ver Apéndice).

El procedimiento de inmunohistoquímica se realizó a temperatura ambiente. Las laminillas se colocaron en jarras Coplin para tratar previamente el tejido a estudiar con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol (ver Apéndice) durante 30 minutos con el fin de eliminar la peróxidasa endógena presente en el tejido; posteriormente, la laminilla se incubó con suero normal de cerdo al 2% en amortiguador de HEPES, cloruro de sodio y cloruro de calcio a pH=7.4 (amortiguador de lavado HNC) conteniendo 0.5% (V/V) de tritón X-100 (ver Apéndice) durante 30 min para bloquear los receptores para el fragmento Fc que presente el tejido, eliminando de esta manera el pegado inespecífico de los anticuerpos utilizados posteriormente. De manera subsecuente se incubó con el anticuerpo a la dilución óptima (previamente determinada) durante 2 horas en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron las laminillas con el amortiguador de lavado (HNC-tween) 3 veces, seguido de un baño breve de 5 minutos en HNC con agitación suave, se incubó con el correspondiente segundo anticuerpo a la dilución óptima (previamente determinada) durante 1 hora en cámara húmeda.

Posteriormente, las secciones se incubaron con el complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (DAKO corp.) en una proporción 1:1 como lo

recomienda el fabricante y a una dilución previamente determinada para evitar el pegado inespecífico. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron con el amortiguador de lavado y posteriormente se añadió el sustrato, que consistió de peróxido de hidrógeno conteniendo 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) en HNC que produce un precipitado color sepia en las regiones inmunorreactivas. Finalmente, se lavó la preparación con agua corriente, se contrastó con hematoxilina de Harris durante un minuto y se sometió al proceso de deshidratación y montaje (Carson 1995).

12. CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE RESULTADOS

En este trabajo se pretendió estudiar dos parámetros que de alguna manera nos dan pauta para poder estudiar la conducta del tumor; los parámetros que se evaluaron en este estudio por medio de inmunohistoquímica fueron el grado de expresión y el patrón de expresión de las E- y N-cadherinas para posteriormente correlacionarlo con el grado de diferenciación del tumor. Es importante recordar que esta técnica inmunohistoquímica nos da una idea semicuantitativa de la expresión de moléculas de adhesión en los cortes de tumores estudiados. Estos dos parámetros se evaluaron de manera independiente como a continuación mencionaré.

La expresión de las cadherinas en los diferentes cánceres humanos que se han estudiado previamente por otros investigadores, entra dentro de la clasificación que a continuación emplearemos para la evaluación de los casos estudiados (Takeichi 1993).

El patrón de expresión es un parámetro que nos da una idea de la distribución celular que tienen las moléculas de cadherinas estudiadas en los diferentes tumores estudiados. Las laminillas tratadas se examinaron por dos observadores a diferentes tiempos y el patrón de expresión de E- y N-cadherina

recomienda el fabricante y a una dilución previamente determinada para evitar el pegado inespecífico. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron con el amortiguador de lavado y posteriormente se añadió el sustrato, que consistió de peróxido de hidrógeno conteniendo 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) en HNC que produce un precipitado color sepia en las regiones inmunorreactivas. Finalmente, se lavó la preparación con agua corriente, se contrastó con hematoxilina de Harris durante un minuto y se sometió al proceso de deshidratación y montaje (Carson 1995).

12. CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE RESULTADOS

En este trabajo se pretendió estudiar dos parámetros que de alguna manera nos dan pauta para poder estudiar la conducta del tumor; los parámetros que se evaluaron en este estudio por medio de inmunohistoquímica fueron el grado de expresión y el patrón de expresión de las E- y N-cadherinas para posteriormente correlacionarlo con el grado de diferenciación del tumor. Es importante recordar que esta técnica inmunohistoquímica nos da una idea semicuantitativa de la expresión de moléculas de adhesión en los cortes de tumores estudiados. Estos dos parámetros se evaluaron de manera independiente como a continuación mencionaré.

La expresión de las cadherinas en los diferentes cánceres humanos que se han estudiado previamente por otros investigadores, entra dentro de la clasificación que a continuación emplearemos para la evaluación de los casos estudiados (Takeichi 1993).

El patrón de expresión es un parámetro que nos da una idea de la distribución celular que tienen las moléculas de cadherinas estudiadas en los diferentes tumores estudiados. Las laminillas tratadas se examinaron por dos observadores a diferentes tiempos y el patrón de expresión de E- y N-cadherina

en el tejido tratado se evaluó en microscopio óptico de acuerdo a los siguientes criterios:

| | |
|------------------|--|
| 1. Reforzamiento | Si la inmunorreactividad del anticuerpo se encuentra en el citoplasma y es de forma granular además de presentar una acentuada inmunorreacción a nivel de la membrana celular (Fig 3G, 3H). |
| 2. Granular | Si se presenta un puntilléo a nivel del citoplasma que puede ser fino o grueso, que puede ser homogéneo (Fig 2A) o heterogéneo en el corte (Fig 2E). |
| 3. Por gradiente | Si la expresión se presenta de manera focal o zonal, es decir, que se observa una mayor inmunorreactividad en las células de áreas bien diferenciadas y una menor inmunorreacción en zonas menos diferenciadas (Fig 3E). |
| 4. Negativo | Cuando no se detecta la presencia de la molécula y la tinción no se distingue del fondo (Fig 2H, 3D). |

El grado de expresión se evaluó de manera semicuantitativa y de acuerdo a la inmunorreactividad que presentó cada uno de los casos con respecto al anticuerpo para la E- y N-cadherina; se asignaron valores numéricos que van de acuerdo a la expresión de las moléculas de adhesión en estudio, los criterios que se asignaron a cada número o nivel fué el siguiente:

| <i>VALOR ASIGNADO</i> | <i>COMENTARIO</i> |
|-----------------------|--|
| 4 | La inmunorreacción es muy fuerte |
| 3 | La inmunorreacción es franca |
| 2 | La tinción se presenta de manera moderada |
| 1 | La inmunorreacción es muy débil |
| Neg | No se presenta inmunorreacción o no se distingue del fondo |

Controles

Los controles que se emplearon en la técnica inmunohistoquímica se utilizaron para determinar la peroxidasa endógena y el pegado inespecífico de los segundos anticuerpos tanto para el segundo anticuerpo biotinilado anti-rata y el biotinilado anti-ratón y que se emplearon en la determinación de E-cadherina y N-cadherina respectivamente y de acuerdo al siguiente protocolo:

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA

| REACTIVO | CONTROL DE PEROXIDASA | E-CADHERINA | CONTROL DE 2o ANTICUERPO ANTI-RATA | N-CADHERINA | CONTROL DE 2o ANTICUERPO ANTI-RATON |
|-------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| H ₂ O ₂ | si | si | si | si | si |
| suero de cerdo | si | si | si | si | si |
| ac.primario | no | si | no | si | no |
| ac.secundario | no | si | si | si | si |
| complejo ABC | si | si | si | si | si |
| DAB | si | si | si | si | si |

- Para la preparación de los reactivos empleados en la técnica inmunohistoquímica revisar el apéndice
- Posterior al ensayo inmunohistoquímico se procede a contrastar, deshidratar y montar las laminillas (ver apéndice)

13. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se analizarán estadísticamente por medio de la prueba de correlación de Spearman para determinar si se presentó alguna asociación significativa entre la expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas definidas del cero al cuatro *versus* los grados de diferenciación presentes en los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón.

Controles

Los controles que se emplearon en la técnica inmunohistoquímica se utilizaron para determinar la peroxidasa endógena y el pegado inespecífico de los segundos anticuerpos tanto para el segundo anticuerpo biotinilado anti-rata y el biotinilado anti-ratón y que se emplearon en la determinación de E-cadherina y N-cadherina respectivamente y de acuerdo al siguiente protocolo:

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA

| REACTIVO | CONTROL DE PEROXIDASA | E-CADHERINA | CONTROL DE 2o ANTICUERPO ANTI-RATA | N-CADHERINA | CONTROL DE 2o ANTICUERPO ANTI-RATON |
|-------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| H ₂ O ₂ | si | si | si | si | si |
| suero de cerdo | si | si | si | si | si |
| ac.primario | no | si | no | si | no |
| ac.secundario | no | si | si | si | si |
| complejo ABC | si | si | si | si | si |
| DAB | si | si | si | si | si |

- * Para la preparación de los reactivos empleados en la técnica inmunohistoquímica revisar el apéndice
- **Posterior al ensayo inmunohistoquímico se procede a contrastar, deshidratar y montar las laminillas (ver apéndice)

13. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se analizarán estadísticamente por medio de la prueba de correlación de Spearman para determinar si se presentó alguna asociación significativa entre la expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas definidas del cero al cuatro *versus* los grados de diferenciación presentes en los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón.

RESULTADOS

14. ESTANDARIZACION DE PARAMETROS VARIABLES

En la técnica de inmunohistoquímica deben controlarse algunos parámetros que interfieren directamente con el resultado a esperar. Los parámetros que se estandarizaron en orden de su realización fueron:

1. Dilución óptima de segundo anticuerpo
2. Dilución óptima de complejo estreptoavidina biotina
3. Dilución óptima de anticuerpo primario

El espécimen empleado para estandarizar las diluciones del segundo anticuerpo, del complejo estreptoavidina biotina y anticuerpo primario fué de un corte seriado de biopsia de pulmón, en el caso de los anticuerpos primarios se utilizó primero un corte seriado de corazón que sirvió para verificar la inmunoreactividad del anticuerpo para la N-cadherina y para la E-cadherina se utilizó un corte seriado de pulmón; para estandarizar las diluciones óptimas de los anticuerpos primarios se utilizó el mismo corte de pulmón que en la estandarización del complejo y los segundos anticuerpos como ya se mencionó anteriormente.

14.1 *Dilución óptima de los segundos anticuerpos*

Se emplearon dos tipos de anticuerpos secundarios, un anticuerpo anti-rata conjugado a biotina y otro anti-ratón conjugado a biotina cada uno con especificidad en contra de la especie en donde se produjeron los anticuerpos a E-cadherina y N-cadherina respectivamente. Las diluciones empleadas fueron las siguientes:

| <i>ANTICUERPOS</i> | <i>DILUCIONES</i> | | |
|--------------------|-------------------|-------|-------|
| anti-rata | 1:250 | 1:500 | 1:750 |
| anti-ratón | 1:250 | 1:500 | 1:750 |

Además de las diluciones empleadas para los segundos anticuerpos se utilizó un control de peroxidasa endógena y la técnica inmunohistoquímica se realizó de acuerdo al protocolo mostrado en la página anterior y eliminando la adición de los anticuerpos primarios.

Los resultados obtenidos en este ensayo nos permitieron establecer la dilución óptima a emplear a las condiciones previamente establecidas; la dilución óptima para ambos anticuerpos secundarios, fué de 1:250 con un tiempo de incubación de una hora como se detalló anteriormente en el protocolo de la técnica inmunohistoquímica.

14.2 *Dilución óptima del complejo estreptoavidina-biotina*

En este ensayo se utilizó un control de peroxidasa y las diluciones variables del complejo estreptoavidina-biotina en un corte seriado de biopsia pulmonar, eliminando la adición del anticuerpo primario y secundario de acuerdo al siguiente esquema:

| <i>REACTIVO</i> | <i>DILUCIONES</i> | | | |
|-----------------|-------------------|-------|-------|-------|
| COMPLEJO | 1:150 | 1:300 | 1:600 | 1:900 |

- El complejo empleado es el streptABComplex/HRP (estreptoavidina-biotina) de DAKO corp

Con respecto al ensayo anterior se sugirió utilizar la dilución más concentrada del complejo ya que no se presentó pegado inespecífico del complejo streptABComplex/HRP en ninguna de las diluciones probadas. La dilución óptima a emplear en la técnica inmunohistoquímica fué de 1:150 y se mantuvo constante para todos los caso empleados.

14.3 Dilución óptima de los anticuerpos primarios

Se utilizaron dos anticuerpos primarios uno dirigido en contra de la molécula E-cadherina y el otro para evidenciar la expresión de la molécula N-cadherina.

La dilución que se utilizó para el anticuerpo E-cadherina y N-cadherina se probó como mencioné anteriormente en cortes seriados de pulmón, de acuerdo al siguiente esquema:

| <i>ANTICUERPOS</i> | <i>DILUCIONES</i> | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-------|-------|
| E-CADHERINA | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 |
| N-CADHERINA | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 |

Es importante mencionar que para verificar la reactividad del anticuerpo anti N-cadherina se emplearon previamente cortes seriados de corazón humano.

Una vez realizados los ensayos de acuerdo al protocolo de inmunohistoquímica y empleando los parámetros previamente estandarizados se observó que la dilución óptima para el anticuerpo primario E-cadherina fué de 1:100 y para el anticuerpo N-cadherina fué de 1:50. Los ensayos subsecuentes se realizaron de acuerdo a las diluciones previamente ensayadas tanto de los anticuerpos primarios, secundarios y la dilución óptima del complejo.

15. ANALISIS DE RESULTADOS

El grupo de prueba para este estudio fué integrado por 85 casos distribuidos de la siguiente manera: 25 adenocarcinomas, 21 casos de cáncer tipo epidermoide, 11 casos de cáncer de células pequeñas, 12 casos de cáncer de células grandes, 16 casos de pulmón normal con zonas de epitelio bronquial y alveolar. Se observó que el grado de expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas presentaban un comportamiento diferente en los tumores por lo que se evaluaron y analizaron de manera independiente.

El grado de expresión de las cadherinas para cada uno de los casos estudiados se evaluó de acuerdo a la reacción que presentaron y se les asignaron valores con respecto al nivel de inmunorreacción que presentaron de acuerdo a los criterios previamente mencionados en criterios para la evaluación de resultados.

15.1 *Expresión de E- y N-cadherinas en cortes histológicos de epitelio pulmonar normal*

Se analizaron cortes histológicos de pulmón normal como un parámetro de referencia para posteriormente poder evaluar los tumores y a su vez, estos cortes se utilizaron como controles positivos para el ensayo inmunohistoquímico. Se estudiaron zonas en las que se observaban células epiteliales bronquiales y/o alveolares, se evaluó la expresión de las moléculas de E- y N-cadherinas considerando el grado y el patrón de expresión (Tabla 1).

El grado de expresión de E-cadherina en las zonas del epitelio pulmonar bronquial iba de fuerte a franco es decir, presentó un nivel de expresión de 4 o 3 respectivamente (Fig 2G). Por otro lado, se observó en la misma zona del pulmón normal que la N-cadherina se expresaba en menor grado ya que se encontró una

inmunorreacción muy débil o moderada (valor asignado 1 o 2 respectivamente) (Figura no mostrada).

Otro parámetro que evaluamos fué el patrón de expresión de la E-cadherina que en estos casos de epitelio bronquial normal fué de manera granular, es decir que la inmunorreacción se presentó en forma de gránulos a nivel del citoplasma y confinada principalmente en la superficie luminal de las células epiteliales ciliadas (Fig 2G). Para la N-cadherina se observó la misma distribución solo que en menor grado (Figura no mostrada).

Las zonas del epitelio alveolar normal expresaron a la molécula E-cadherina de manera débil (valor asignado 1) y no se presentó inmunorreacción para la N-cadherina (Figuras no mostradas).

15.2 *Expresión de E- y N-cadherinas en carcinomas pulmonares*

Adenocarcinomas

El grupo de adenocarcinomas (ADCA) estudiados estuvo compuesto por 25 casos que de acuerdo a su grado de diferenciación se agruparon de la siguiente manera, de los ADCA bien diferenciados (BD) se estudiaron 9 casos, de los moderadamente diferenciados (MD) se estudiaron 8 casos y por último de los poco diferenciados (PD) se estudiaron 8 casos.

De acuerdo a los datos obtenidos y mostrados en la Tabla 1 se observó que el comportamiento del grupo de los ADCA BD con respecto al grado de expresión de la molécula E-cadherina fué el siguiente: de los 9 casos que conforman este grupo, 7 de ellos que representan al 76% presentaron una tinción homogénea fuerte que corresponde al valor de 4 (Fig 2A); de estos 9 casos, un caso que corresponde al 12% presentó un grado de expresión franco o 3, y sólo un caso que corresponde al 12% presentó un grado de expresión débil o 1, en este grupo no se presentaron casos negativos.

De los 8 casos que conforman el grupo de los ADCA MD, 5 casos que corresponden al 63% presentó un grado de expresión franco o 3, 2 casos que corresponden al 24% presentaron un grado de expresión moderado o 2 y sólo un caso que corresponde al 13% presentó un grado de expresión débil o 1, este grupo de tumores tampoco presentó casos negativos.

Con respecto al grupo de los 8 casos de ADCA PD se observó lo siguiente: un caso de los 8 que corresponde al 13% del grupo presentó una tinción fuerte que corresponde a 4, otro caso que corresponde de igual manera al 13% presentó una tinción franca o 3 (Fig 2E), otro caso presentó una tinción moderada o 2, otros 3 casos que corresponden al 38% presentaron una tinción débil o 1 y los últimos 2 casos que corresponden al 24% no presentaron inmunorreactividad a la E-cadherina.

Por otro lado, la expresión de la N-cadherina fué de la siguiente manera, del grupo de los ADCA BD que esta integrado por 9 casos, uno de ellos que representa al 12% presentó un grado de expresión fuerte que corresponde al valor asignado 3 (Fig 2B), de los 9 casos totales 4 de ellos que corresponden al 44% presentó una tinción moderada o 2 (Fig 2D), 3 de ellos que corresponden al 33% presentó una tinción débil o 1 y un caso que corresponden al 12% no presentó inmunorreacción a la molécula N-cadherina.

Del grupo de los ADCA MD que esta integrado por 8 casos, 3 de ellos que corresponden al 38% presentaron un grado de expresión moderado o 2, otros 3 casos presentaron un grado de expresión débil o 1 y los 2 casos restantes que corresponden al 24% de los casos no presentaron inmunorreacción a la N-cadherina.

Del grupo de los ADCA PD que esta integrado por 8 casos, un caso que corresponde a un 13% presentó un grado de expresión moderado o 2, otro caso presentó una tinción débil y los 6 casos restantes que corresponden al 74% no presentaron inmunorreacción a la N-cadherina (Fig 2F).

En este grupo histológico se encontró por la prueba no paramétrica de Spearman que existe una correlación significativa del grado de expresión de E- y N-cadherinas con respecto al grado de diferenciación presente en los 25 Adenocarcinomas estudiados con una $r = 0.656$ y $P=0.00$ para E-cadherina y una $r = 0.527$ y $P=0.007$ para N-cadherina.

Un aspecto importante de mencionar es que cuando se comparó el grado de expresión entre la E- y N-cadherina en un mismo caso, el comportamiento de los grupos de tumores en su mayoría (67%) fué de la siguiente manera: en los tumores ADCA BD el 45% de los casos se teñían fuertemente para la E-cadherina y de manera heterogénea como se puede observar en el recuadro de la Fig 2C y moderadamente para la N-cadherina como se ve en el recuadro de la Fig 2D, es decir un valor de E-cadherina con 4 y para la N-cadherina con 2, estos casos

presentaron una diferencia de dos grados abajo para la expresión de la N-cadherina; en otros casos (22%) se observó un comportamiento similar es decir, el grado de expresión para la E-cadherina fué 4 mientras que para la N-cadherina fué de 1 (Fig 4A).

En los ADCA MD observamos algo similar al comparar el grado de expresión de la E-cadherina contra la N-cadherina por cada caso, pero en este grupo no fué tan drástica la disminución de la expresión para la N-cadherina ya que el 37% de los casos presentó una expresión franca para la E-cadherina y un grado de expresión moderado para la N-cadherina es decir un 3 vs 2; en este grupo de tumores observamos que existe una diferencia de sólo un nivel abajo para el grado de expresión de la N-cadherina con respecto a la E-cadherina, el 24% de los casos en este grupo también presentó un grado de expresión abajo para la E- y N-cadherina a valores asignados de 2 vs 1 (Fig 4B).

En el grupo de los ADCA PD observamos que un 37% de los casos presentó un grado de expresión de E-cadherina débil o 1 contra la no expresión de la N-cadherina como se observa en la Fig 2F y otro 24% de los casos no expresó ninguna de las dos moléculas de cadherina estudiadas (Fig 4C).

En cuanto al patrón de expresión de los ADCA con respecto a la E-cadherina fué de manera granular homogénea como se observa en la Fig 2A o heterogénea como se ve en la Fig 2C y 2E.

Para la N-cadherina el patrón de expresión fué de igual manera granular pero con una distribución citoplásmica diferente con respecto a lo observado para la E-cadherina incluso en la misma zona del tumor, como se observa en la Fig 2A y 2B en donde en el mismo tumor (incluso se trata de la misma área tumoral) se comparan las tinciones para E- y N-cadherina respectivamente y se observa claramente que la tinción tiene una diferente disposición en la célula.

Un detalle importante que cabe mencionar es que en los diferentes grados de diferenciación que muestran los tumores evaluados, el patrón de expresión se

presenta de la misma manera es decir que, tumores poco y bien diferenciados presentan patrones de expresión granulares homogéneos y heterogéneos.

Carcinomas epidermoides

El carcinoma epidermoide a diferencia del ADCA esta compuesto por una población de células heterogéneas ya que dentro de un mismo tumor encontramos células BD y PD. El grado de diferenciación en este tipo de tumores se asigna de acuerdo a la diferenciación de las células que se presentan en mayor proporción, lo que resulta de alguna manera arbitrario.

El grupo de carcinomas tipo epidermoide fué integrado por 21 casos de los cuales 9 eran BD, 10 eran MD y sólo 2 casos eran carcinomas epidermoides PD (Ver Tabla 1). Con respecto a la expresión de E-cadherina en este grupo se presentó el siguiente comportamiento: de los 9 casos que integran el grupo de carcinomas epidermoides BD, 4 de ellos que corresponden al 44% de los casos presentó un grado de expresión fuerte o 4 (Fig 3E) y los otros 5 casos que corresponden al 56% presentó un grado de expresión franco que corresponde a 3 (Fig 3G y 3H), en este grupo no se presentaron casos con un grado de expresión moderado, débil ni casos negativos.

El grupo de los carcinomas epidermoides MD que fué integrado por 10 casos presentó el siguiente comportamiento: un caso que corresponde al 10% presentó una inmunorreacción fuerte o 4, 4 casos que corresponden al 40% de los casos presentó una tinción franca o 3, otros 4 casos que corresponden al 40% de los casos presentó una tinción moderada o 2 y sólo un caso de los 10 que integran al grupo y que corresponde al 10% no presentó reactividad al anticuerpo anti-E-cadherina.

El grupo de carcinomas epidermoides PD fué integrado por 2 casos, un caso presentó un grado de expresión débil o 1 y corresponde al 50% y el otro caso que corresponde al 50% no presentó inmunorreacción al anticuerpo anti-E-

cadherina. En este grupo de tumores, la muestra fué muy pequeña pero de alguna manera dentro de los cortes histológicos de los casos con un mayor grado de diferenciación, se podían encontrar zonas con diferentes grados de diferenciación, es decir que se observaban zonas bien diferenciadas y zonas poco diferenciadas y se observaba que en las zonas poco diferenciadas la inmunorreacción era muy débil o negativa, lo que correlaciona con lo expresado en el grupo pobremente diferenciado.

Con respecto a la expresión de la molécula N-cadherina se observó que de los 9 casos que integran el grupo de los carcinomas epidermoides BD, 2 casos que corresponden al 22% presentó una tinción franca o 3, otros 2 casos que corresponden al 22% presentaron una inmunorreacción moderada o 2, 4 casos que corresponden al 44% presentaron una tinción débil (Fig 3F) y sólo un caso que corresponde al 12% de los casos no presentó inmunorreacción a la N-cadherina (Tabla 1).

El grupo de los carcinomas epidermoides MD que estuvo integrado por 10 casos presentó el siguiente comportamiento: 3 casos (30%) presentaron una tinción moderada o 2, otros 3 casos presentaron una tinción débil o 1 y 4 casos de los 10 que corresponden al 40% no presentaron inmunorreacción a la N-cadherina (Tabla 1).

Del grupo de los carcinomas epidermoides PD que fué integrado por 2 casos, ninguno presentó inmunorreacción a la N-cadherina.

De los 21 casos de carcinoma epidermoide estudiados y analizados por la prueba de correlación de Spearman se encontró que existe una correlación significativa del grado de expresión de E- y N-cadherinas con respecto al grado de diferenciación con una $r = 0.692$ y $P=0.00$ para E-cadherina y $r = 0.470$ y $P=0.0313$ para N-cadherina.

Al comparar el grado de expresión de E- y N-cadherina por caso observamos que en los carcinomas epidermoides BD un 23% bajó 3 niveles para

el grado de expresión (4 vs 1), otro 22% bajó 2 niveles para el grado de expresión (3 vs 1) y el resto (55%) bajó en sólo un nivel el grado de expresión para E- y N-cadherina respectivamente (Fig 5A).

En las Fig 3E y 3F puede observarse de manera evidente la disminución en el grado de tinción para E- y N-cadherina en el mismo tumor ya que en el recuadro de la Fig 3E se observa un caso de tumor epidermoide con un grado de expresión 4 (fuerte) y en el recuadro de la Fig 3F se observa el mismo tumor con la tinción para la N-cadherina con un valor asignado de 1 (débil).

En los carcinomas epidermoides MD (Fig 5B) se observa que un 40% de los casos bajan en un sólo nivel el grado de expresión es decir que, el 20% de los casos bajó de 2 vs 1 y otro 20% bajó de 3 vs 2 para E- y N-cadherina respectivamente. Los otros casos tienen un comportamiento similar es decir que la expresión de N-cadherina baja con respecto al grado de expresión para la E-cadherina.

En la Fig 5C se ejemplifican los carcinomas epidermoides PD que se estudiaron y se encontró que prácticamente son negativos para ambas moléculas.

En otro aspecto y con respecto al patrón de expresión de la molécula E-cadherina, en los carcinomas epidermoides éste fué con reforzamiento por gradiente o focal, es decir que en las subpoblaciones de células bien diferenciadas se presentó una inmunorreacción franca, de manera granular y en la mayoría de los casos observamos reforzamiento de membrana que está indicado con una punta de flecha en los recuadros de las Fig 3G y 3H mientras que en las zonas con células moderadamente diferenciadas se presentó una inmunorreacción moderada y en las zonas de células poco diferenciadas no se presentó inmunorreacción o en algunos casos fué muy débil. La inmunorreacción se observó de manera homogénea o heterogénea en los cortes además de ser granular en las células tumorales y fué a nivel de citoplasma (Fig 3E).

El patrón de expresión para la N-cadherina en los carcinomas epidermoides fué también por gradiente o focal, a nivel de citoplasma, granular y de manera homogénea o heterogénea un aspecto importante es que no se presentó reforzamiento y se encuentra disminuída con respecto a la E-cadherina.

En la Fig 3E se observa un caso epidermoide BD con un grado de expresión de 4 (fuerte), es muy evidente observar el patrón de expresión focal o por gradiente para ambas moléculas es decir, en las zonas bien diferenciadas observamos una tinción fuerte y en las zonas MD y PD se ve disminuída la reacción e incluso negativa, en la Fig 3F se observa el homólogo, la N-cadherina para el mismo tumor y es evidente la disminución en el grado de expresión (débil o 1) también se ve claramente el patrón de expresión que de igual manera es focal o por gradiente.

En general el patrón de expresión para ambas moléculas E- y N-cadherina en los casos es de manera focal o por gradiente, granular y citoplásmica en ambos grados de diferenciación (BD y MD) y en el caso de los carcinomas epidermoides PD no se presentó inmunorreacción a la N-cadherina.

Carcinoma de células pequeñas

El grupo de carcinoma de células pequeñas estuvo compuesto por 11 casos de los cuales 9 que corresponden al 82% no expresaron E-cadherina (Fig 2H) y sólo dos sí la expresaron, un caso que corresponde al 9% presentó una inmunorreacción franca o 3 y el otro caso que corresponde a otro 9% presentó una tinción débil o 1 (Tabla 1).

Con respecto a la N-cadherina, 10 casos de los 11 que integran al grupo y que corresponden al 91% no expresó la molécula N-cadherina y sólo un caso que corresponde al 9% presentó un grado de expresión débil o 1 (Tabla 1).

Con respecto al patrón de expresión que presentaron los dos carcinomas de células pequeñas tanto para la E-cadherina y N-cadherina fué de manera granular, homogéneo y a nivel de citoplasma.

Carcinoma de células grandes

Este grupo de carcinomas esta compuesto por 12 casos que por sus características histopatológicas no se integran dentro de las clasificaciones de los carcinomas antes mencionadas, por lo que este grupo *per se* es muy heterogéneo, considerando ésto y observando los resultados de la tabla 1 observamos que 3 casos que integran al grupo y que corresponden al 25% de los tumores estudiados presentaron un grado de expresión fuerte que corresponde a 4 (Fig 3A) y otros 3 casos que corresponden al 25% presentó un grado de expresión franco o 3, otros 2 casos que corresponden al 16% presentó un grado de expresión moderado o 2 y 3 casos que corresponden a otro 25% presentaron una tinción débil (Fig 3C) y sólo un caso de los 12 que integran al grupo y que corresponde al 9% de los casos no expresó la E-cadherina (Fig 3D).

En cuanto al grado de expresión para la N-cadherina el comportamiento de este grupo de células grandes fué de igual manera irregular, ya que un caso de los 12 que corresponde al 9% presentó un grado de expresión fuerte o 3, 4 casos que corresponden al 33% presentó un grado de expresión moderado o 2, otros 4 casos presentaron un grado de expresión débil o 1 (Fig 3B) y los 3 casos restantes que conforman el grupo y que corresponden al 25% no expresó a la molécula N-cadherina (Fig 3D).

Con respecto al patrón de expresión de la E-cadherina para este grupo de tumores fué de igual manera muy irregular ya que algunos casos presentaron un patrón granular homogéneo (Fig 3A) y a nivel de citoplasma como en los ADCA y otros casos presentaron un patrón focal o por gradiente y con reforzamiento como en el caso de los carcinomas de tipo epidermoide.

En cuanto al patrón que se presentó para la N-cadherina fué asimismo irregular, en algunos casos se encontró un patrón granular homogéneo (Fig 3B) y en otros focal o por gradiente y sin reforzamiento.

En cuanto al grado de expresión de la molécula N-cadherina se presentó disminuído con respecto a lo observado para la E-cadherina en el mismo caso estudiado (Fig 6). Al comparar por caso la expresión de E- y N-cadherinas observamos que el comportamiento de este grupo, como se mencionó anteriormente, fué muy irregular al igual que para el grado de expresión y patrón de expresión, ya que observamos que en algunos casos la disminución en el grado de expresión de la N-cadherina con respecto a E-cadherina fué de uno, dos y hasta tres niveles abajo (Fig 6).

16. RELACION DE TABLAS Y FIGURAS

GRADO DE EXPRESION

| TIPO HISTOLOGICO | No. de casos | E-CADHERINA | | | | | | | | N-CADHERINA | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------|-------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 4 (%) | 3 (%) | 2 (%) | 1 (%) | neg (%) | 4 (%) | 3 (%) | 2 (%) | 1 (%) | neg (%) | 4 (%) | 3 (%) | 2 (%) | 1 (%) | neg (%) | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EPITELIO NORMAL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bronquial | 10 | 7 | 70 | 3 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 60 | 4 | 40 | 0 | 0 | |
| Alveolar | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 50 | 3 | 50 | 3 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 100 | |
| Total | 16 | 5 | 31 | 5 | 31 | 0 | 3 | 19 | 3 | 19 | 3 | 19 | 0 | 0 | 6 | 37 | 4 | 26 | 6 | 37 | |
| ADENOCARCINOMA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BD | 9 | 7 | 76 | 1 | 12 | 0 | 0 | 1 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 44 | 3 | 33 | 1 | 12 | |
| MD | 8 | 0 | 0 | 5 | 63 | 2 | 24 | 1 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 38 | 3 | 38 | 2 | 24 | |
| PD | 8 | 1 | 13 | 1 | 13 | 1 | 13 | 3 | 38 | 2 | 24 | 0 | 0 | 0 | 1 | 13 | 1 | 13 | 6 | 74 | |
| Total | 25 | 8 | 32 | 7 | 28 | 3 | 12 | 5 | 20 | 2 | 8 | 0 | 0 | 1 | 4 | 8 | 7 | 28 | 9 | 36 | |
| EPIDERMIOIDE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BD | 9 | 4 | 44 | 5 | 56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 22 | 2 | 22 | 4 | 44 | 1 | 12 |
| MD | 10 | 1 | 10 | 4 | 40 | 4 | 40 | 0 | 0 | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 3 | 30 | 3 | 30 | 4 | 40 | |
| PD | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 50 | 1 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | |
| Total | 21 | 5 | 24 | 9 | 43 | 4 | 19 | 1 | 5 | 2 | 9 | 0 | 0 | 2 | 10 | 5 | 24 | 7 | 33 | 7 | 33 |
| CELULAS PEQUEÑAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total | 11 | 0 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 1 | 9 | 9 | 82 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 9 | 10 | 91 | |
| CELULAS GRANDES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total | 12 | 3 | 25 | 3 | 25 | 2 | 16 | 3 | 25 | 1 | 9 | 0 | 0 | 1 | 9 | 4 | 33 | 4 | 33 | 3 | 25 |

GRADO DE DIFERENCIACION:

BD: Bien diferenciado

MD: Moderadamente diferenciado

PD: Poco diferenciado

TABLA 1

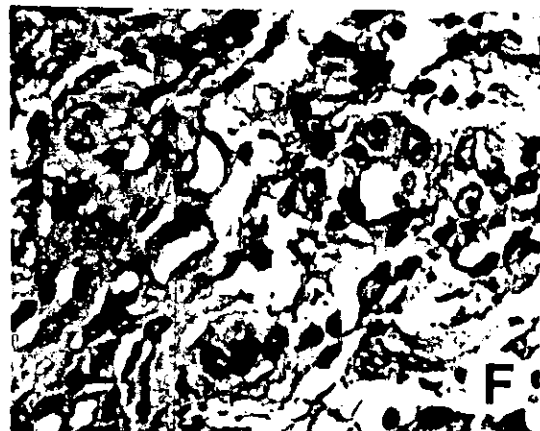
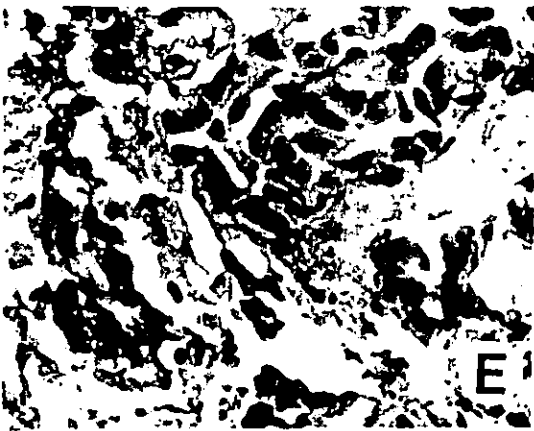
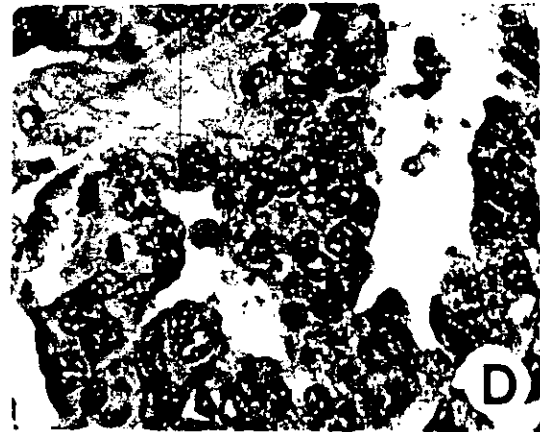
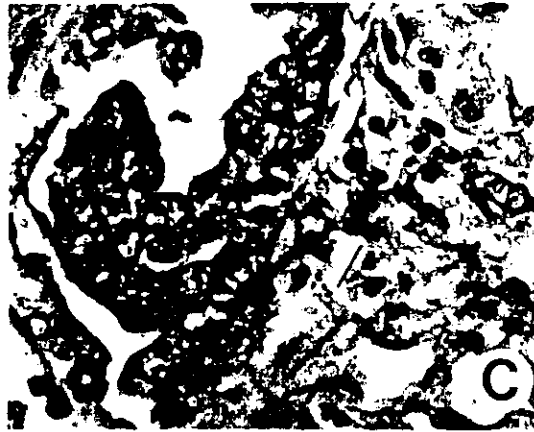
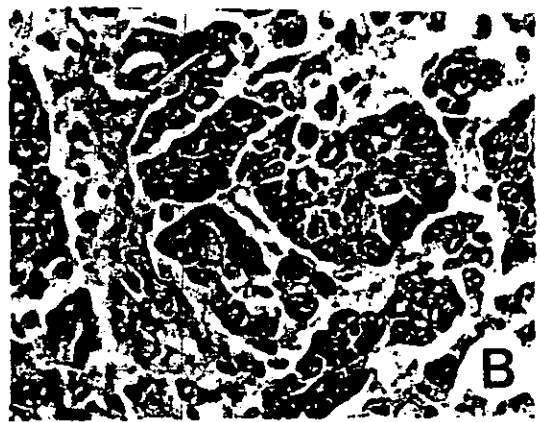
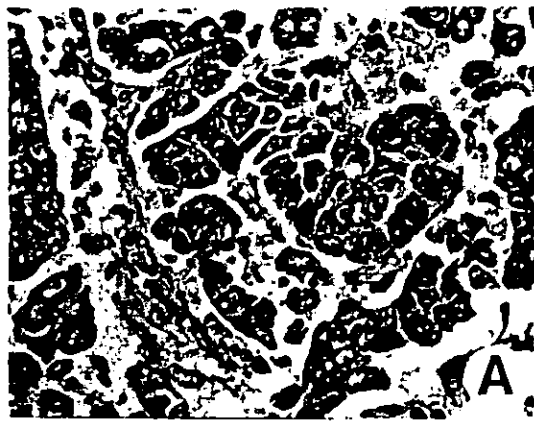


FIG 2

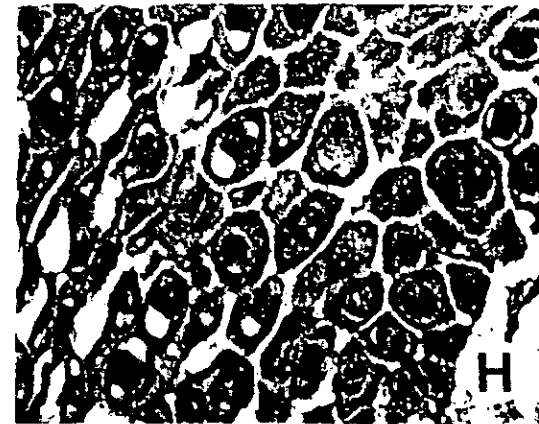
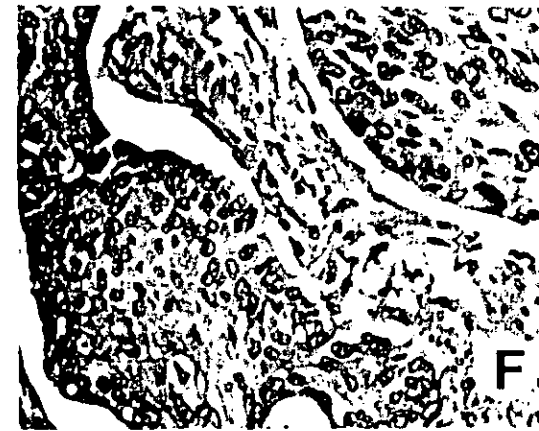
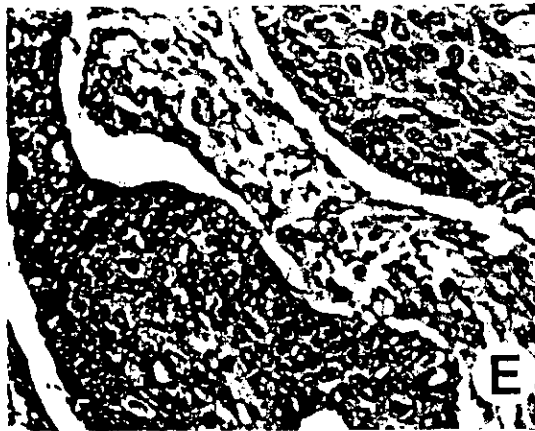
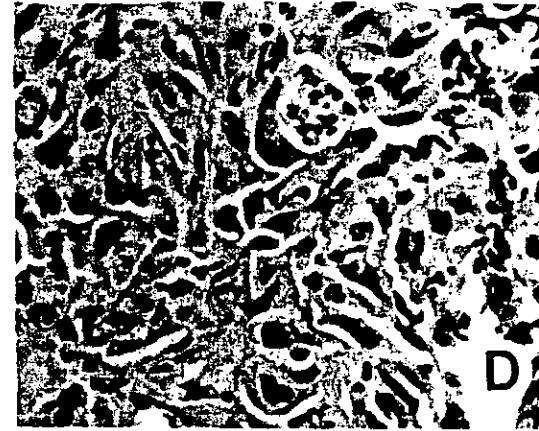
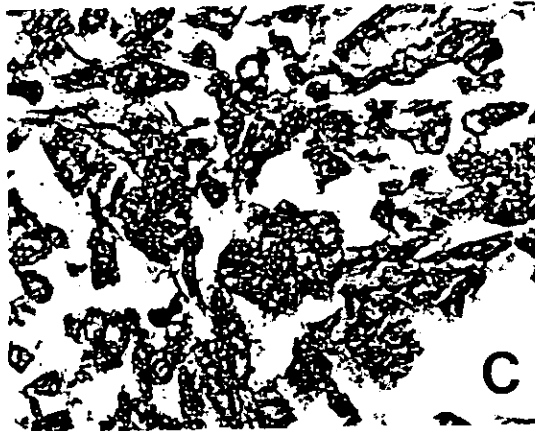
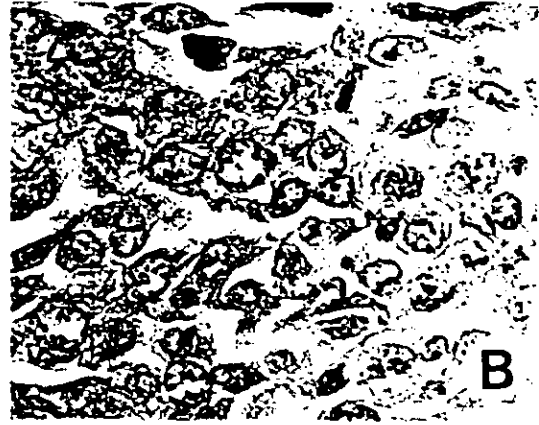
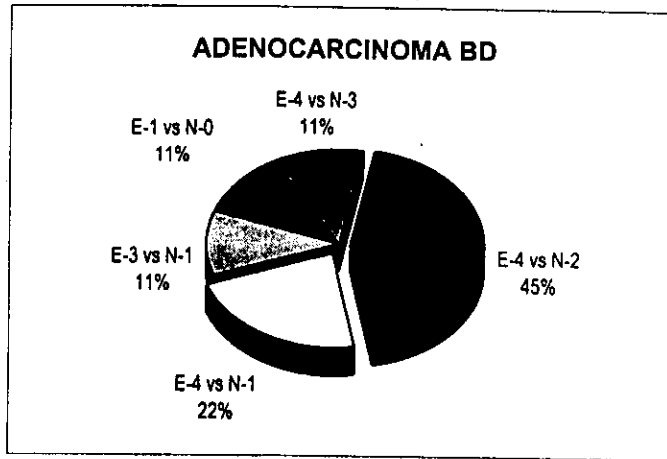


FIG 3

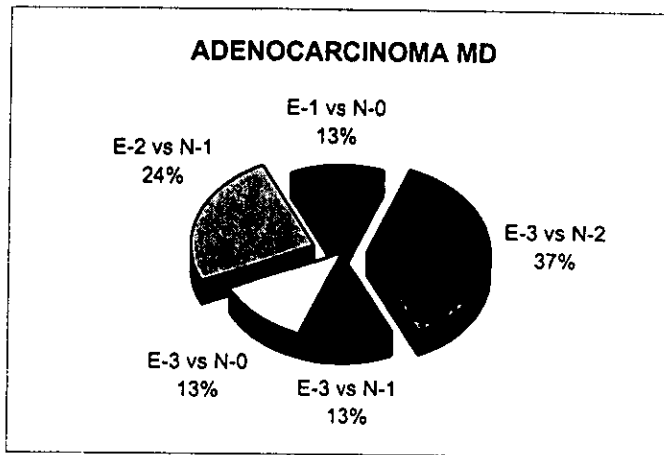
FIG 2. Inmunolocalización de E- y N-cadherina en ADCA, epitelio normal y carcinoma de células pequeñas. Expresión de E-cadherina en un ADCA BD, con un grado de expresión fuerte y un patrón granular homogéneo (A). El mismo campo del ADCA anterior para la inmunotinción de N-cadherina, es evidente la disminución del grado de expresión (B). Expresión de E-cadherina en un ADCA BD con un patrón granular heterogéneo (C). El mismo caso anterior para N-cadherina con un grado de expresión disminuído (D). ADCA PD con un grado de expresión franco (3) para E-cadherina y un patrón granular heterogéneo (E). El homólogo para N-cadherina del caso anterior, con una inmunotinción negativa (F). Epitelio bronquial normal, es evidente la expresión de la E-cadherina en las células epiteliales ciliadas (G). Carcinoma de células pequeñas (granos de avena) que no expresó E-cadherina ni N-cadherina (H). Los recuadros anteriores están contrastados con hematoxilina de Harris y tienen un aumento de 40X.

FIG 3. Expresión de E- y N-cadherinas en carcinomas de células grandes y carcinomas epidermoides. Inmunolocalización de E-cadherina en un carcinoma de células grandes, con un grado de expresión fuerte y un patrón granular homogéneo (A), el homólogo del caso anterior para N-cadherina, es evidente la disminución en la expresión (B). Carcinoma de células grandes con un grado de expresión débil para la E-cadherina con un patrón granular homogéneo (C). Un caso de carcinoma de células grandes negativo para E- y N-cadherinas (D). Los recuadros anteriores están contrastados con hematoxilina de Harris y tienen un aumento de 40X. Carcinoma epidermoide con un grado de expresión fuerte para la E-cadherina, con un patrón por gradiente (E), el homólogo para el caso anterior para N-cadherina, es evidente la disminución en el grado de expresión y el patrón por gradiente (F). Los recuadros anteriores están contrastados con hematoxilina de Harris y tienen un aumento de 20X. Carcinoma epidermoide nótese (punta de flecha) el patrón con reforzamiento, es evidente la inmunorreacción a nivel de membrana (G); Carcinoma epidermoide o escamoso nótese la distribución de las células en escamas y el patrón con reforzamiento (punta de flecha). Los recuadros G y H están contrastados con hematoxilina de Harris y tienen un aumento de 40X.

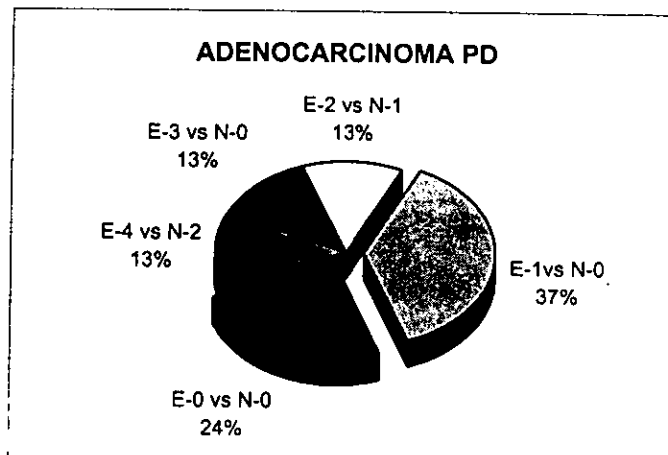
**RELACION DE LA EXPRESION DE E- Y N-CADHERINA
POR CASO**



A



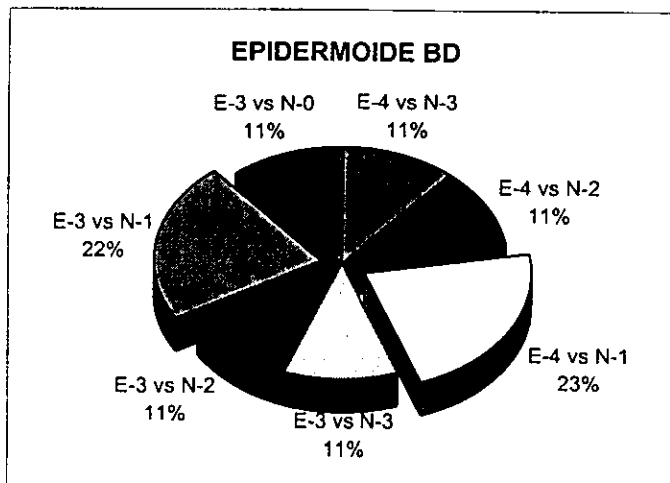
B



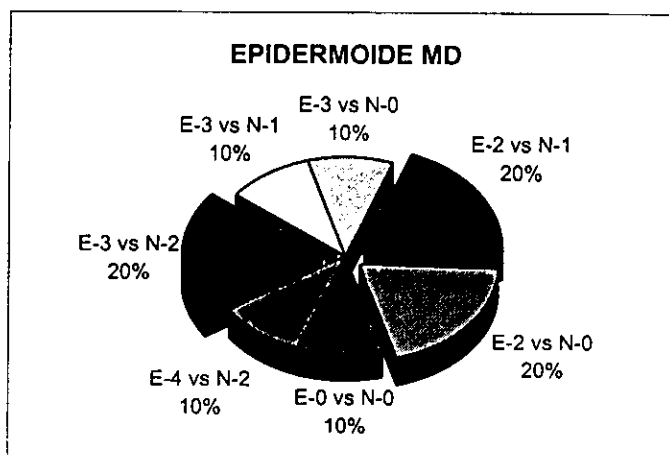
C

FIG 4

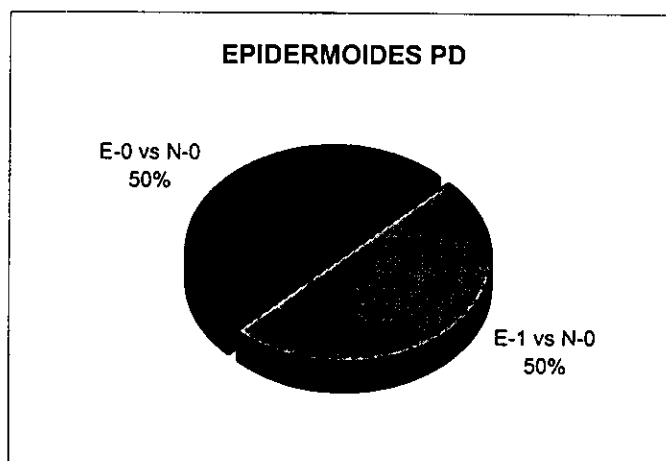
RELACION DE LA EXPRESIÓN DE E- Y N- CADHERINA POR CASO



A



B



C

FIG 5

RELACION DE LA EXPRESION DE E- Y N-CADHERINA POR CASO

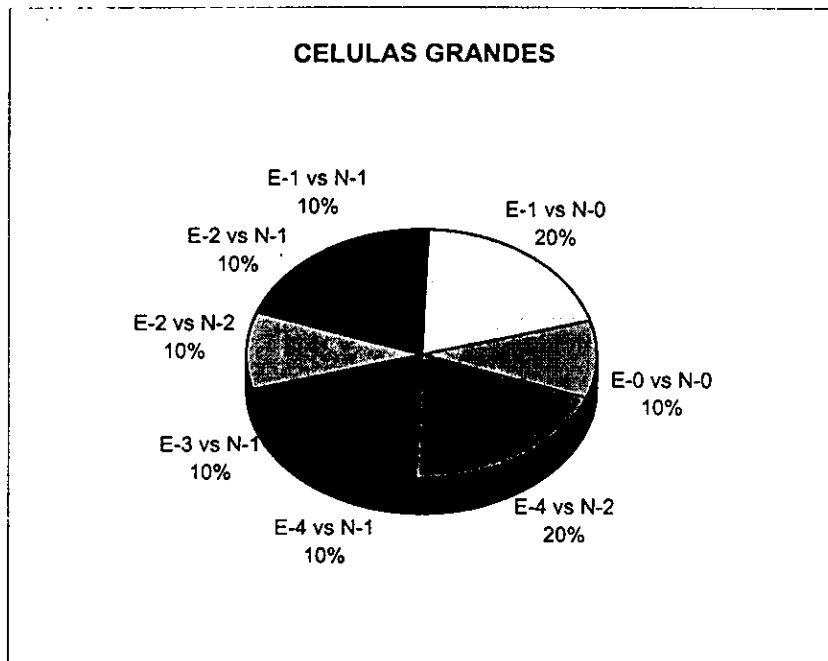


FIG 6

FIG 4, 5 y 6. RELACION DE LA EXPRESION DE E- Y N-CADHERINA POR CASO. En estos gráficos se confrontan los grados de expresión de E-cadherina y su homólogo, N-cadherina en un mismo tumor. Claves: E- y N- es el tipo de cadherina expresada, los dígitos implican el grado de expresión que se presentó en cada caso. Los porcentajes mostrados reflejan los casos que presentaron un comportamiento determinado es decir, en la Fig 4A el 45% de los Adenocarcinomas bien diferenciados presentó un grado de expresión fuerte o 4 para E-cadherina y su homólogo N-cadherina presentó un grado de expresión moderado o 2, nótese la evidente disminución en el grado de expresión para la N-cadherina en el mismo espécimen.

DISCUSION

El cáncer de pulmón está constituido por tumores con características histopatológicas muy heterogéneas, sus tumores derivan de células progenitoras diferentes, su agresividad clínica es muy variada y consecuentemente el pronóstico de los pacientes. Por su comportamiento clínico, el cáncer de células pequeñas es el más agresivo y tiende a ser más metastásico en procesos tempranos de la enfermedad, mientras que el cáncer de tipo epidermoide tiende a localizarse en la cavidad torácica y las metástasis son menos frecuentes. La agresividad de los adenocarcinomas es intermedia entre estos tipos de tumores pulmonares. Los factores específicos que determinan la agresividad de estos tumores es muy variada y de éstos, la capacidad de invasión y metástasis que presentan las células tumorales es una característica muy importante. Una característica que favorece que un tumor pueda tener capacidad invasiva y metastásica es la pérdida de la cohesión celular y es en este proceso de adhesión en donde la participación de la familia de las cadherinas juegan un papel decisivo (Shiosaky 1997).

Los carcinomas pulmonares en estudio derivan del tejido epitelial pulmonar, en los controles de epitelio pulmonar que utilizamos observamos que la molécula E-cadherina se expresa en las células de epitelio bronquial normal, mostrando un patrón granular a nivel de citoplasma y confinada preferentemente a la superficie luminal de las células epiteliales ciliadas, con un grado de expresión fuerte. Con respecto a la N-cadherina se observó el mismo patrón de expresión pero en menor grado, lo que refleja una menor expresión de esta molécula en la células estudiadas.

En cambio, en la zona de epitelio alveolar la expresión de la molécula E-cadherina fué muy débil, probablemente por su estructura laxa y el poco contacto entre las células. La expresión de la molécula N-cadherina en el epitelio alveolar

no se presentó. Algunos reportes previos mencionan que la expresión de la molécula E-cadherina se presenta tanto en las células epiteliales bronquiales como en las células epiteliales alveolares, aunque en estas últimas la tinción es débil (Sorscher 1995, Bongiorno 1995, Shimoyama 1989). Otro grupo de investigación sugiere una fuerte expresión de E-cadherina en el epitelio alveolar y bronquial lo que coincide parcialmente con nuestras observaciones (Böhm 1994).

En los carcinomas de tipo ADCA, el grado de expresión que presenta la E-cadherina correlaciona con el grado de diferenciación presente en las células neoplásicas. Nuestros resultados coinciden con las observaciones de Böhm y cols (Böhm 1994) a pesar de que ellos trabajaron cortes histológicos de muestras preservadas en congelación y emplearon un anticuerpo monoclonal obtenido de una clona diferente. Otro grupos (Takeichi 1993, Sorscher 1995, Sulzer 1998) han empleado condiciones similares a las nuestras, obteniendo resultados semejantes, es decir que los tumores que presentan una mayor diferenciación mantienen niveles altos de E-cadherina mientras que los tumores desdiferenciados muestran niveles reducidos de ella.

La expresión de la N-cadherina en los carcinomas de tipo ADCA mostró una drástica disminución con respecto a lo observado para la E-cadherina ya que una gran proporción de los tumores ADCA BD y MD expresaron muy débilmente esta molécula. En relación a la inmunorreacción de esta molécula en carcinomas pulmonares existen reportes de un grupo de investigadores que emplean un anticuerpo diferente al nuestro y utilizan tanto cortes parafinados como congelados, encontrando en ambos reportes que los ADCA muestran una débil expresión e incluso negativa de la N-cadherina, lo que correlaciona con nuestros resultados (Soler 1995, Han 1997).

Este tipo histológico a pesar de que mantiene la expresión de la E-cadherina y presenta una evidente expresión reducida para la N-cadherina y de acuerdo con los resultados del epitelio normal en donde se presenta la expresión

de ambas moléculas, pudiera sugerir una explicación del comportamiento clínico que presenta este grupo.

En relación a los carcinomas epidermoides observamos que la expresión de la E-cadherina correlaciona de manera directa con el grado de diferenciación que presentaron los tumores. Además esta molécula se expresó tanto a nivel citoplásmico como a nivel de membrana en las células que mostraban un mayor grado de diferenciación, lo que sugiere una mayor adhesión intercelular en este tipo de células. A pesar de que hay pocos estudios (Sulzer 1998, Sorscher 1995) en este tipo de tumor pulmonar, los reportes sugieren un comportamiento similar al que fué descrito por nosotros a pesar que un grupo de ellos utilizó un anticuerpo de una clona diferente a la que nosotros empleamos.

En un estudio previo realizado en líneas celulares (Sullivan 1997) se observó que la expresión de la E-cadherina en las líneas de origen epidermoide presentaron un patrón menos alterado que en las líneas de adenocarcinoma lo que correlaciona con nuestros resultados y que sugiere que los estudios realizados *in vitro* en líneas celulares pueden compararse, en este caso, con el comportamiento de los tumores pulmonares.

Por otro lado, la expresión de la N-cadherina en los carcinomas epidermoides se observó que se encuentra disminuída pero no es tan drástica esta disminución como la que presentaron los ADCA, el hecho de que estas células expresen tanto a E- y N-cadherinas y además presenten una acentuada expresión de E-cadherina a nivel de membrana podría sugerir que estas células tienen un sistema de adhesión menos alterado y consecuentemente pudieran tener menos posibilidades de liberarse del tumor primario y adquirir conductas invasivas y metastásicas, con respecto a lo anterior nuestros resultados explican el comportamiento clínico menos agresivo que presentan estos tumores con respecto al grupo de ADCA y al de los carcinomas de células pequeñas.

En el tipo histológico de células pequeñas, las moléculas de E- y N-cadherina no se expresan como se esperaba ya que suponíamos que por ser de

origen neural expresarían a la molécula N-cadherina e incluso también a la E-cadherina por ser un tumor derivado de epitelio, pero en nuestros resultados observamos que no se presentó inmunorreacción a ninguna de las dos cadherinas estudiadas.

Nuestros resultados coinciden con un estudio previo realizado en líneas celulares de células pequeñas en donde no se observa la expresión de E-cadherina (Sullivan 1997), lo que correlaciona con nuestros resultados obtenidos a partir de muestras de tumores.

Nuestros resultados parecen indicar que los carcinomas de células pequeñas presentan importantes alteraciones en su mecanismo de adhesión lo que se refleja en la no expresión de E- y N-cadherina y pudiera sugerir que este tipo de células tengan más posibilidades de poder migrar y generar procesos de invasión y metástasis, lo que de alguna manera correlaciona con el comportamiento clínico que presentan este tipo de tumores.

El grupo de los carcinomas de células grandes presentó un comportamiento muy irregular en cuanto al grado y al patrón de expresión de la E-cadherina y no encontramos ninguna correlación con respecto al grado y al patrón de expresión en este grupo, con respecto a la N-cadherina observamos que presentó una expresión reducida pero de igual manera no se observó ninguna tendencia, suponemos que es debido a que histopatológicamente este grupo es muy heterogéneo y estos tumores no comparten entre sí las mismas características ya que con respecto a su localización esta puede ser periférica como en el ADCA o central como en el carcinoma epidermoide. Este hecho, de alguna manera coincide con estudios histopatológicos, que sugieren que este tipo de tumor es producto de un carcinoma tipo ADCA o carcinoma epidermoide muy desdiferenciado y que de alguna manera ha perdido las características histopatológicas de las células de las cuales derivó, estas características de heterogeneidad en el grupo pueden verse reflejadas en nuestros resultados.

Con respecto al comportamiento de las cadherinas en otros tumores, observamos que en estudios previos se ha sugerido al igual que nosotros que existe una marcada correlación con respecto a la pérdida de expresión de la E-cadherina y la desdiferenciación en algunos otros carcinomas. Esta correlación se ha estudiado en cáncer de próstata (Umbas 1992, Umbas 1994), cáncer de mama (Oka 1993, Shiosaki 1991), vejiga urinaria (Ross 1995, Syrigos 1995), cáncer de esófago (Shiosaki 1991), cáncer de cabeza y cuello (Sorscher 1995a). En relación a la expresión de la molécula N-cadherina en carcinomas humanos no existen reportes a la fecha.

Una excepción con respecto a la correlación del grado de expresión de la E-cadherina y el grado de diferenciación es el cáncer gástrico, en donde se ha reportado que la expresión de ésta es uniforme y preservada tanto en los tumores bien diferenciados como en los tumores poco diferenciados (Shimoyama 1991, Shiosaki 1991).

Consideraciones a futuro

Como ya mencioné en la introducción, se ha estudiado previamente que las cadherinas funcionan como un sistema integrado en donde intervienen otras moléculas llamadas cateninas y se sugiere que la disfunción de este complejo cadherina-catenina daña el mecanismo de adhesión intercelular, sería importante estudiar que pasa con estas cateninas en los tumores pulmonares o también observar por métodos de biología molecular que pasa con la expresión de las cadherinas y cateninas en este tipo de tumores, ya que es necesario el correcto ensamblaje del complejo cadherina-cateninas para que se lleve a cabo de manera adecuada la adhesión intercelular y homotípica de las células epiteliales.

Basados en estas observaciones y las anteriores, se sugiere continuar con el estudio de las moléculas de E- y N-cadherinas-cateninas como un complejo funcional para explicar el comportamiento de las células tumorales en pulmón y

para futuro poderlo utilizar como un marcador pronóstico o de malignidad de ayuda clínica en el área oncológica.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- ❖ La expresión de E-cadherina en el epitelio bronquial normal fué granular citoplásmico y confinado preferentemente en la superficie luminal y con respecto a la N-cadherina se presentó un comportamiento de expresión semejante pero en menor grado. En el epitelio alveolar la expresión de E-cadherina fué muy débil y no se presentó inmunorreacción para la N-cadherina.
- ❖ La expresión de la molécula E-cadherina en el grupo de ADCA y carcinomas epidermoides presenta una correlación directa con respecto al grado de diferenciación.
- ❖ La expresión de la molécula N-cadherina se encuentra disminuída con respecto a la E-cadherina y correlaciona con el grado de diferenciación en los carcinomas epidermoides y en los ADCA.
- ❖ La disminución del grado de expresión de la N-cadherina con respecto a la E-cadherina en los ADCA es más evidente que en los carcinomas epidermoides.
- ❖ La localización de la molécula E-cadherina en los tumores tipo ADCA bien diferenciados y carcinomas epidermoide bien diferenciados es diferente ya que en estos últimos es citoplásmica y acentuada a nivel de membrana.
- ❖ El carcinoma de células pequeñas no expresa E-cadherina ni N-cadherina.
- ❖ En los carcinomas de células grandes la expresión de E- y N-cadherinas presentó un comportamiento errático.

BIBLIOGRAFIA

- Aberle H, Schwartz H, Kemler R. (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61:514-523
- Albelda SM, Buck CA. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4:2868-2880
- Barth AM, Näthke IS, Nelson WJ. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:683-690
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B. (1991). Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67:233-245
- Birchmeier W, Behrens J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1198:11-26
- Birchmeier W. (1995). E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays* 17:97-99
- Birchmeier W, Behrens KM, Weidner J, Hülsken J, Birchmeier C. (1996). Epithelial differentiation and the control of metastasis in carcinomas. In: Attempts to understand metastasis formation II: Metastasis-related molecules. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin 1996. pp 118-128
- Böhm M, Totzeck B, Birchmeier W, Wieland I. (1994). Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 12:55-62
- Bongiorno PF, Al-Kasspooles M, Lee SW, Rachwal WJ, Moore JH, Whyte IR, Orringer MB, Beer DG. (1995). E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus. *Br J Cancer* 71:166-172
- Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. In: Attempts to understand metastasis formation I:

- Metastasis-related molecules. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin. pp 123-147
- Butz S, Kemler R. (1994). Distinct cadherin-catenin complexes in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett* **355**:195-200
 - Carson FL. (1994). Immunohistochemistry. In: Histotechnology a self-instructional text. ASCP American Society of Clinical Pathologists. Chicago. pp 231-248
 - Furukawa Y, Nakatsuru S, Nagafuchi A, Tsukita S, Muto T, Nakamura Y, Hori A. (1994). Structure, expression and chromosome assignment of the human catenin (cadherin-associated protein) alpha 1 gene (CTNNA 1). *Cytogenet Cell Genet* **65**:74-78
 - Gaetje R, Korzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski A. (1997). Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* **150**:461-467
 - Gazdar AF, Carbone DP. (1994). The impact of lung cancer. In: The biology and molecular genetics of lung cancer. RG Landes company. Dallas Texas. pp 1-25
 - Geiger B, Ayalon O. (1992). Cadherins. *Ann Rev Cell Biol* **8**:307-332
 - Grunwald GB. (1993). The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent CAMs. *Curr Opin Cell Biol* **5**:797-805
 - Gumbiner BM, McCrea PD. (1993). Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci* **17**:155-158
 - Gumbiner BM. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-357
 - Han AC, Peralta-Soler A, Knudsen KA, Wheelock MJ, Johnson KR, Salazar H. (1997). Differential expression of N-cadherin in pleural mesotheliomas and E-cadherin in lung adenocarcinomas in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* **28**:641-645

- Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* **120**:215-227
- Hedrick L, Cho KR, Volgestein B. (1993). Cell adhesion molecule as tumour suppressors. *Trends Cell Biol* **3**:36-39
- Herrenknecht K, Ozawa M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Lenter M, Kemler R. (1991). The uvomorulin anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:9156-9160
- Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ. (1994). Dynamics of cadherin-catenin complex formation: Novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**:1327-1340
- Hirai Y, Nose A, Kabayashi S, Takeichi M. (1989). Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. *Development* **105**:263-270
- Hynes RO. (1992). Integrins: Versatility, Modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25
- Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H. (1997). Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms. *Hum Pathol* **28**:613-622
- Kemler R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trend Genet* **9**:317-321
- Kim YS, Liotta LA, Kohn EC. (1994). Capacidad invasiva del cáncer y metástasis. *Hosp Practice* **3**:204-208
- Klymkowsky MW, Parr B. (1995). The body language of cells: The intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell* **83**:5-8
- Knudsen KA, Myers L, Mc Elwee SA. (1990). A role for the Ca-dependent-adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res* **188**:175-184

- Knudsen KA, Peralta Soler A, Johnson KR, Wheelock MJ. (1995). Interaction of alfa-actinin with the cadherin-catenin cell-cell adhesion complex via alfa-catenin. *J Cell Biol* **130**:67-77
- Koukoulis GK, Patriarca C, Gould VE. (1998). Adhesion molecules and tumor metastasis. *Hum Pathol* **29**:889-892
- Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG. (1994). Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* **23**:272-274
- Lampugnani MG, Dejana E. (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* **9**:674-682
- Larson RS and Springer TA. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* **114** :181-217
- Lazcano PE, Tovar GV, Meneses GF, Rascon PR, Hernández AM. (1997). Trends of lung cancer mortality in México. *Arch Med Res* **28**:565-570
- Mareel M, Botenberg T, Noë V, Bruyneel E, Bracke M. (1996). Molecular aspects of cancer metastasis: extracellular regulation of the E-cadherin-catenin complex. *Int J Develop* **1**:65S-66S
- Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y. (1992). Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer* **66**:1122-1130
- Mc Crea PD, Turck CW, Gumbiner B. (1991). A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* **254**:1359-1361
- Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarría JG, Rebora FT. (1996). Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer* **14**:185-193
- Minoo P, King RJ. (1994). Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. *Ann Rev Physiol* **56**:13-45

- Miyatani S, Shimamura K, Hatta M, Nagafuchi A, Nose A, Matsunaga M, Hatta K, Takeichi M. (1989). Neural cadherin: Role in selective cell-cell adhesion. *Science* **245**:631-635
- Munro SB, Blaschuk OW. (1996). The structure, function and regulation of cadherins. In: *Cell Adhesion and Invasion in cancer metastasis*. Ed. Chapman and Hill. 1996. **3**:17-34
- Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. (1991). The 102 Kd cadherin associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* **65**:849-857
- Netter FH. (1989). Colección CIBA de ilustraciones. Sistema respiratorio. Edit. Salvat. Tomo VII. pp 158-162.
- Nose A, Tsuji K, Takeichi M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* **61**:147-155
- Oka H, Shiosaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takarsuka Y, Marsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, Mori T. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* **53**:1696-1701
- Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* **267**:385-389
- Ozawa M, Engel J, Kemler R. (1990a). Single a.a. substitution in one Ca binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* **63**:1033-1038
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. (1990b). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4246-4250
- Peifer M, Mc Crea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner B. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins β -catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* **118**:681-691

- Phina B. (1996). General Introduction In: Cell Adhesion and invasion in cancer metastasis. Ed. *Chapman and Hill*. Chapter 1. pp:3-7
- Pignatelli M. (1993). E-cadherin: a biological marker of tumour differentiation. *J Pathol* **171**:81-82
- Pignatelli M, Vessey CJ. (1994). Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol* **25**:849-856
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181**:64-78
- Reynolds AB, Daniel J, Mc Crea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120^{cas} associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* **14**:8333-8342
- Ross JS, Rosario AD, Figge HL, Sheehan C, Fisher HA, Bui HX. (1995). E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* **26**:940-944
- Shapiro L, Fannon AF, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**:327-337
- Shimoyama Y, Hirohashi S. (1991). Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* **51**:2185-2192
- Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. (1991). Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* **139**:17-23
- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. (1996). E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* **77**:1605-13
- Siu CH. (1996). Cell adhesion receptors. A general Introduction. In: Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. Ed. *Chapman and Hill*. Chapter 2. pp:9-16

- Soler PA, Knudsen KA, Jaurand MC, Johnson KR, Wheelock MJ, Klein-Szanto AJP, Salazar H. (1995). The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* **26**:1363-1369
- Sorscher SM, Russack V, Cagle M, Feramisco JR, Green MR. (1995). Immunolocalization of E-cadherin in human head and neck cancer. *Arch Pathol Lab Med* **119**:82-84
- Sorscher SM, Russak V, Graziano S, Cagle M, Feramisco JR, Green MR. (1995). Immunohistochemical evaluation of E-cadherin and epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Modern Pathol* **8**:450-455
- Sullivan LG, Vázquez IL, Pérez AT, Hernández AG. (1997). Expresión de la molécula E-cadherina en líneas celulares de carcinomas de pulmón. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* **10**:7-12
- Sulzer MA, Leers MP, Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH. (1998). Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **157**:1319-1323
- Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, Pandha H, Rowlinson-Busza G, Verne J, Epenetos AA, Pignatelli M. (1995). E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumour stage and survival. *Int J Cancer (Pred Oncol)* **64**:367-370
- Takeichi M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**:639-655
- Takeichi M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann Rev Biochem* **59**:237-252
- Takeichi M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**:1451-1455

- Takeichi M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5:806-811
- Tang DG, Honn KV. (1994). Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 14:109-122
- Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB. (1992). Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52:5104-5109
- Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Ewout H, Karthaus HF, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 54:3929-3933
- Varela H, Borrat O, López MV, Rodríguez C. (1996). Cyfra 21.1 un nuevo marcador tumoral en el carcinoma broncopulmonar. *Bioquímica* 21:586-592
- Vestweber D, Kemler R. (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J* 4:3393-3398
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-1192
- Weinberg RA. (1996). How cancer arises. *Scientific American* 275:32-40
- Williams AF, Barclay AN. (1988). The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol* 6:381-405

APENDICE

AMORTIGUADOR HNC pH=7.4

| | |
|--|--------|
| HEPES (10 mM) ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico | 3.5 g |
| Cloruro de calcio (2mM) | 0.3 g |
| Cloruro de sodio (150mM) | 13.1 g |
| Ajustar pH=7.4, aforar a 1500mL | |

AMORTIGUADOR DE LAVADO (HNC-tween 0.1%)

| | |
|------------|---------|
| HNC pH=7.4 | 1000 mL |
| tween 20 | 1 mL |

SOLUCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO AL 3%

| | |
|--------------------------------------|-------|
| H ₂ O ₂ al 30% | 3 mL |
| Metanol | 30 mL |

SOLUCION HNC- 2% SUERO- 0.5%(V/V)TRITON TX-100

| | |
|-----------------|---------|
| Suero de cerdo | 0.4 mL |
| HNC | 20.0 mL |
| Tritón (TX-100) | 0.1 mL |

SOLUCION DE DIAMINOBENCIDINA (DAB)

| | |
|-------------------------------|---------|
| DAB | 4.0 mg |
| HNC | 10.0 mL |
| H ₂ O ₂ | 4.0 µL |