

11236
33



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Dirección de Enseñanza e Investigación

EXPRESION Y LOCALIZACION DE LA MOLECULA DE
 β -CATENINA EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
LARINGE

T E S I S

Que presenta:

DR. GONZALO/JIMENEZ ORCI

Para obtener el grado de:

ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGIA

TUTOR:

DR. ANTONIO SODA MERHY

CO-TUTORES:

DRA. LISETTE CRISTERNA SANCHEZ

DR. JOSE SULLIVAN LOPEZ GONZALEZ

DRA. MA. EUGENIA VAZQUEZ MANRIQUEZ

QFB. DOLORES AGUILAR CAZARES

INER

México, D. F.

Septiembre del 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



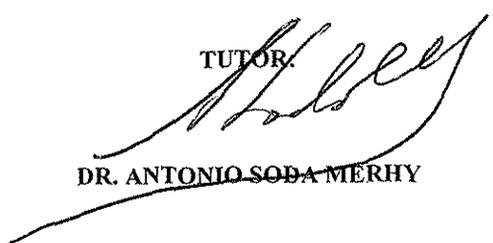
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

TUTOR.


DR. ANTONIO SODA MERHY

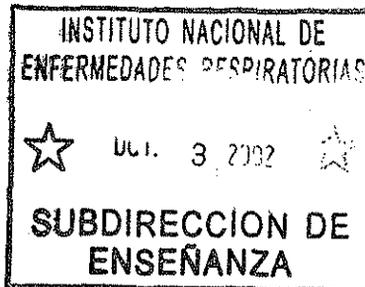
CO-TUTORES:

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ

DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

DRA. MA. EUGENIA VÁZQUEZ MANRÍQUEZ

QFB. DOLORES AGUILAR CÁZARES



Agradecimientos:

Al Dr. Antonio Soda Merhy por haberme permitido la oportunidad de participar en el curso de especialización en Otorrinolaringología mostrándome siempre dedicación y entusiasmo.

A mis PADRES quienes han sido estímulo y apoyo en todos los momentos de mi vida.

A la Dra. Lissete Cristerna Sánchez por tantas muestras de confianza y lecciones de perseverancia ejemplo de trabajo.

Al Dr. José Sullivan López González por todo su esfuerzo vertido en este trabajo.

A la Dra. Ma. Eugenia Vázquez Manríquez por su amabilidad en dedicarme todo ese tiempo extra de trabajo para poder realizar este trabajo.

A la QFB Dolores Cázares Aguilar por apoyo en este trabajo

Al Dr. José Luis Mendez Vera por su inspiración en este trabajo.

A la Lic. Mónica Sánchez Pacheco ("La pequeña") aliento en el caminar de mi vida.

A mis grandes amigos y compañeros de trabajo Juan Emilio, Román, Armando, Juan José, Reynaldo, Claudia quienes me han enseñado a trabajar en grupo.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVO	5
HIPÓTESIS	5
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	13
BIBLIOGRAFÍA	14
TABLAS Y FIGURAS	16

INTRODUCCIÓN

El cáncer de laringe permanece como el segundo tumor maligno en frecuencia en la región de cabeza y cuello, 25% de los casos, siendo el carcinoma epidermoide el tipo histológico predominante en 90% de los casos. La Sociedad Americana del Cáncer estimó 10,100 casos nuevos de cáncer de laringe en el año 2000 con aproximadamente 3,900 muertes asociadas a este padecimiento, en México en 1999 se reportó 811 muertes por cáncer de laringe.(1,2)

La proporción de hombre-mujer es de 4.1 a 1 atribuyéndose un 85% de los casos a tabaquismo y alcoholismo aunque se conocen agentes carcinogénicos como son asbesto, níquel y algunos aceites minerales., así mismo se ha relacionado el reflujo laringofaríngeo como cofactor de carcinogenesis laríngea produciendo inflamación aguda y crónica que puede conllevar a transformación maligna. Encontrándose enfermedad localizada en un 60%, 25% enfermedad local y metastásica a ganglios regionales y 15% enfermedad avanzada o metastásica a distancia o ambas. Esta enfermedad tiene una mayor incidencia en la sexta a séptima década de la vida, presentándose en la mayoría de los casos en estadios avanzados y con una tasa general de sobre vivencia del 67% a 5 años(1,3).

Mediante las técnicas de inmunohistoquímica en el campo de la biología celular, se ha revolucionado el campo de la investigación donde se han podido identificar marcadores de proliferación celular.

ADHESIÓN CELULAR

Desde la década pasada ha sido aparente que las moléculas de adhesión juegan un papel mas que estructural y están críticamente involucradas en múltiples procesos de transducción de señales.

Estos aspectos de adhesión celular están siendo investigados básicamente para entender el comportamiento de las cascadas de señalización para uso farmacológico.

Muchos de los estudios tempranos en moléculas de adhesión y las señalizaciones involucraban a los receptores de las células de adhesión de la familia de las integrinas, aunque hay ahora numerosos ejemplos de familias de receptores de adhesión implicadas en transducción de señales incluyendo las cadherinas, selectinas, sindecans y la familia de las inmunoglobulinas (Ig CAMS).

Hay una creciente percepción en la cooperación que involucra la formación de la organización de los componentes de las cascadas de señalizaciones intercelulares. Al parecer los elementos del citoesqueleto que contiene actina son esenciales en esta formación. Además de las integrinas y cadherinas una variedad de importantes familias de receptores y ligandos están involucradas en la función neural, incluyendo el grupo de ephrin tirosina cinasas, (4) las neutrinas y sus receptores (5), las semaforinas y los

receptores plexina (6) y algunos otros. Una vez mas la complejidad biológica del desarrollo neural precluye detallada consideración de estas familias de receptores de adhesión adicionales en el presente contexto. La adhesión celular también afecta eventos distales, a las vías de señalización iniciales, incluyendo el ciclo celular y la muerte celular programada.

FAMILIAS DE RECEPTORES DE ADHESIÓN

Las funciones y estructuras de las familias de receptores de adhesión celular serán mencionadas brevemente en esta revisión debido que no son relevantes para la discusión de este estudio.

CADHERINAS

La adhesión celular juega un papel importante en la morfogénesis del tejido y es mediada por los complejos cadherina/catenina (7-8).

Las cadherinas son una familia de glicoproteínas transmembranales que median la adhesión celular homotípica dependientes de Ca^{2+} en casi todos los tejidos sólidos (7-8). La E-cadherina se expresa en las células epiteliales y su localización es en las uniones adherentes. El dominio citoplásmico de la E-cadherina se asocia a un grupo de proteínas que colectivamente son llamadas cateninas. La β -catenina interactúa directamente con la E-cadherina mientras que la α -catenina es reclutada al complejo por su interacción con la β -catenina (figura A). La α -catenina sirve como un conector entre la adhesión celular y el citoesqueleto basado en actina (7-8).

Cuando la β -catenina no se encuentra participando en el en el complejo de adhesión celular, la β -catenina libre es secuestrada en un complejo formado por la molécula "adenomatous polyposis coli" (APC), una cinasa sintetasa glicógeno-treonina-serina (GSK-3 β), y una proteína adaptadora axina (o su homólogo conductina) permitiendo la fosforilación y la degradación de la β -catenina por el sistema ubiquitina-proteasoma.

Se ha reportado que la β -catenina también participa como componente de la vía de señalización debida a Wnt. Cuando la vía Wnt entrega una señal mitótica, la proteína llamada dishevelled (Dsh) se activa. La Dsh activada regula a la baja el complejo APC/GSK-3B/Axina para que no pueda fosforilar a la β -catenina para su degradación. Cambios mutacionales del complejo de degradación y en su fosforilación o de la β -catenina, resultan en la estabilización de la proteína de β -catenina. En cualquier caso la β -catenina libre se asocia a la familia de factores de transcripción Tcf/LEF-1 para translocarse al núcleo, activando la transcripción de genes específicos que favorecen el crecimiento celular o su capacidad invasora (figura B).

Algunos tumores albergan mutaciones en los genes que codifican el APC o la β -catenina. Estas mutaciones resultan en una permanente activación de genes, debido a la formación constante del complejo β -catenina-Tcf, consecuentemente la localización nuclear de la β -catenina ha sido reportada. (9-10) En este estudio fue de interés estudiar el papel de la β -catenina en la desdiferenciación del carcinoma de laringe para progresar en el entendimiento histopatológico de este carcinoma.

INTEGRINAS

Miembros de la familia de las integrinas (glicoproteínas de superficie celular) actúan como receptores para las proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágeno. Los sitios de adhesión célula-matriz extracelular mediadas por las integrinas forman un complejo especializado de estructuras llamadas contactos focales o adhesiones focales (11). Las integrinas son heterodímeros, teniendo una subunidad α y una subunidad β , cada subunidad tiene un dominio grande extracelular, una región expansora de membrana y un dominio corto citoplasmático (excepto para la subunidad $\beta 4$) (12,13). El receptor para la familia de las integrinas o vertebrados incluyen por lo menos 18 distintas subunidades α y 8 subunidades β . Las integrinas tienen cambios dinámicos durante el proceso de unión de ligandos, incluyendo movimientos relativos de subunidades y cambios conformacionales dentro de sus dominios (14,15). Las integrinas pueden existir en varios estados de afinidad para sus ligandos, que pueden ser regulados por factores extracelulares (eg. cationes divalentes) o por complejos intracelulares que involucran las GTPasas pequeñas R-Ras y Rap 1. El dominio citoplasmático de una integrina permite la interacción con estructuras intracelulares y genera una cascada de señalización. Los dominios citoplasmáticos de las subunidades α y β hacen contribuciones importantes en varios aspectos de la función de las integrinas, incluyendo la organización del citoesqueleto, la movilidad celular, transducción de señales y regulación de la afinidad de las integrinas. Un número importante de adaptadores y proteínas de señalización pueden interactuar con los dominios citoplasmáticos de las integrinas que pueden jugar un papel en las funciones mediadas por las integrinas.

FAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS Ig-CAM

Las Ig CAMs son un grupo diverso de receptores de adhesión. Miembros de esta familia son definidos por la presencia de una o más copias de repliegues de inmunoglobulinas y una estructura compacta de dos residuos de cisteínas separados por los aminoácidos 55 y 75 arreglados en dos hojas β antiparalelas (16). Típicamente las Ig CAMs tienen un dominio extracelular amino terminal que contiene repliegues de inmunoglobulinas, un segmento en hélice transmembranal y una cola citoplasmática (10).

Miembros de la familia de las Ig CAMs participan en una variedad de tipos celulares y están involucrados en muchos de los diferentes procesos biológicos. Uno de los más importantes procesos, es en el desarrollo del sistema nervioso, donde diferentes miembros de esta familia están involucrados en la guía de los axones y el establecimiento del mantenimiento de las conexiones neurales (14). El clásico ejemplo de un receptor de adhesión de la familia Ig neural es el NCAM, que contiene cinco repliegues de inmunoglobulina en su porción extracelular (17). NCAM funciona como receptor de adhesión célula-célula independiente de calcio, homotípico, aunque el mecanismo preciso de interacción se mantiene en controversia. Algunas otras moléculas de adhesión celular neurales pertenecen a la familia de las Ig, incluyendo la L1, molécula de adhesión celular glial neural (Ng CAM), TAG1, contactina y Drosophila faciiclina II (17,18). Otro grupo de

las Ig CAMs importante en el desarrollo neural son los receptores , como los detectados en carcinoma de colon (DCC), que interactúan con neutrinas similares a laminina en la matriz extracelular y proveen guías específicas para la migración de los axones (16). Otro grupo de receptores Ig CAM involucrados en el desarrollo neural son una docena de miembros de la subfamilia Eph o cinasas tirosina transmembranal que unen ligandos (ephrins) o células vecinas (1). Las Ig-CAMs pueden estar involucradas en interacciones adhesivas homotípicas (NCAM) o heterotípicas (DCC, cinasas Eph).

Es poco lo conocido entre las interacciones Ig-CAMs con las proteínas citoplásmicas. Una posibilidad es la unión entre L1 y actina mediada por ankyrina (17). Miembros de la subfamilia de la molécula de adhesión intercelular (ICAM) de las Ig-CAMs claramente interactúan con serrina en una forma aumentada de PIP2; serrina es un miembro de la familia de proteínas serrina/radoxina/moesina que sirven para unir directamente receptores de membrana al citoesqueleto de actina (18). Aunque parece que interacciones desconocidas del citoesqueleto existen que contribuyen a las funciones de las Ig-CAMs.

SELECTINAS

Las moléculas P, L, E-selectina son una pequeña familia de receptores de adhesión parecidos a lectina (19). La estructura de selectina incluye un dominio amino terminal que es homólogo a las lectinas dependientes de calcio, seguido por un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), de dos a nueve proteínas reguladoras de complementos que se repiten, un segmento en hélice transmembrana y una cola citoplásmica corta. Las selectinas median interacciones célula-célula heterotípicas por reconocimiento de glicanos conteniendo ácido siálico dependientes de calcio. Un papel fisiológico importante para las selectinas incluye la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y plaquetas durante los procesos de inflamación (20), pero otras funciones de las selectinas han sido reportadas (21). Hay una regulación estricta de la expresión y función de las selectinas para aparecer en determinados tiempos, como cuando los leucocitos se asocian a las paredes vasculares durante el tráfico celular normal del sistema inmune o durante la inflamación. Ligandos fisiológicos para las selectinas incluyen sacáridos del grupo Lewis unidos a ácido siálico (22). La participación más documentada de estas moléculas, es en la asociación con PSGL-1, una glicoproteína transmembranal tipo mucina encontrada en leucocitos y células linfoides (23). Se conoce poco acerca de la asociación de las selectinas con el citoesqueleto. Un reporte ha indicado la interacción entre los dominios citoplásmicos de la L-selectina con la α -actina (24); aunque interacciones adicionales del citoesqueleto pueden existir.

JUSTIFICACIÓN

Con respecto al cáncer epidermoide de laringe existen muy pocos estudios sobre la expresión de β -catenina. Se ha descrito que la molécula de β -catenina modula la adhesión intercelular en los epitelios y que una alteración en su expresión conduce a procesos de invasión y metástasis. Se ha descrito en los últimos años que la molécula de β -catenina también actúa en la expresión de genes así como en el comportamiento celular mediado por la vía de señalización WNT.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y localización de la molécula β -catenina en el carcinoma epidermoide de laringe en diferentes grado de diferenciación celular.

HIPÓTESIS

La pérdida de expresión de la molécula de β -catenina a menor grado de diferenciación tumoral en el carcinoma epidermoide de laringe representaría disminución de la adhesividad intercelular. Así mismo la localización nuclear de la molécula β -catenina, podría indicar activación de la vía WNT.

JUSTIFICACIÓN

Con respecto al cáncer epidermoide de laringe existen muy pocos estudios sobre la expresión de β -catenina. Se ha descrito que la molécula de β -catenina modula la adhesión intercelular en los epitelios y que una alteración en su expresión conduce a procesos de invasión y metástasis. Se ha descrito en los últimos años que la molécula de β -catenina también actúa en la expresión de genes así como en el comportamiento celular mediado por la vía de señalización WNT.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y localización de la molécula β -catenina en el carcinoma epidermoide de laringe en diferentes grado de diferenciación celular.

HIPÓTESIS

La pérdida de expresión de la molécula de β -catenina a menor grado de diferenciación tumoral en el carcinoma epidermoide de laringe representaría disminución de la adhesividad intercelular. Así mismo la localización nuclear de la molécula β -catenina, podría indicar activación de la vía WNT.

JUSTIFICACIÓN

Con respecto al cáncer epidermoide de laringe existen muy pocos estudios sobre la expresión de β -catenina. Se ha descrito que la molécula de β -catenina modula la adhesión intercelular en los epitelios y que una alteración en su expresión conduce a procesos de invasión y metástasis. Se ha descrito en los últimos años que la molécula de β -catenina también actúa en la expresión de genes así como en el comportamiento celular mediado por la vía de señalización WNT.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y localización de la molécula β -catenina en el carcinoma epidermoide de laringe en diferentes grado de diferenciación celular.

HIPÓTESIS

La pérdida de expresión de la molécula de β -catenina a menor grado de diferenciación tumoral en el carcinoma epidermoide de laringe representaría disminución de la adhesividad intercelular. Así mismo la localización nuclear de la molécula β -catenina, podría indicar activación de la vía WNT.

TIPO DE INVESTIGACIÓN

Es un estudio prospectivo, transversal, observacional, analítico y abierto

ELEMENTOS DEL ESTUDIO

1. Grupo problema

En el periodo comprendido de enero del 2000 a diciembre del año 2001, se seleccionaron 38 pacientes del Departamento de Otorrinolaringología del INER con el diagnóstico clínico, radiológico e histológico de carcinoma epidermoide, y lesiones premalignas (leucoplaquia, eritroplaquia) de laringe.

Criterios de Inclusión de grupo problema

- a) Pacientes con el diagnóstico histológico de carcinoma epidermoide de laringe
- b) Pacientes con diagnóstico clínico de cáncer de laringe
- c) Pacientes con el diagnóstico radiológico de carcinoma de laringe
- d) Pacientes con diagnóstico clínico, histológico y/o radiológico de lesiones premalignas de laringe (leucoplaquia, eritroplaquia).
- e) Pacientes que acepten la realización del protocolo de estudio de patología laringea.

2. Grupo Control

En el mismo periodo se incluyeron 15 pacientes con carcinoma epidermoide, lesiones premalignas o enfermedad inflamatoria (nódulos, pólipos) de laringe, pero con presencia de mucosa sana.

Criterios de Inclusión del grupo testigo o control

- a) Pacientes con presencia histológica, clínica y radiológica de carcinoma epidermoide de laringe, pero con epitelio de laringe libre de tumor.
- b) Pacientes con diagnóstico clínico, histológico y radiológico de lesiones premalignas de laringe (eritroplaquia, leucoplaquia) pero con epitelio libre de tumor.
- c) Pacientes sin presencia histológica, clínica y radiológica de cáncer epidermoide de laringe y/o lesiones premalignas, pero con lesiones inflamatorias (nódulos, pólipos) y epitelio sano de laringe.
- d) Pacientes sometidos a protocolo de estudio (microlaringoscopia de suspensión con toma de biopsia) para diagnóstico de alguna patología laringea.

Criterios de Exclusión del grupo problema y grupo control

- a) Pacientes que presenten otro diagnóstico histológico laringeo diferente al referido en los criterios de inclusión.
- b) Pacientes sin presencia de epitelio libre de carcinoma, lesión premaligna o proceso inflamatorio de laringe.
- c) Pacientes que presenten muestra histológica insuficiente.
- d) Pacientes que no cuentan con los estudios de laboratorio y/o gabinete necesarios para realizar el protocolo de estudio de patología laringea.
- e) Pacientes que no acepten la realización del protocolo de estudio.

MATERIAL Y METODOS

A los 53 pacientes incluidos en el estudio se le realizó lo siguiente (tabla3):

En el Departamento de Otorrinolaringología:

- 1) Historia clínica completa.
- 2) Los estudios de laboratorio completos.
- 3) Los estudios de gabinete (radiografía anteroposterior de tórax, tomografía lineal de cuello y tomografía computarizada de cuello).
- 4) Procedimiento quirúrgico (Microlaringoscopia directa de suspensión con toma de biopsia).

En el Departamento de Patología:

- 1) Las muestras de tejido enviadas se fijaron en formol al 10%.
- 2) Se procesaron en formol al 10% durante dos horas y posteriormente con dos alcoholes del 96%, dos alcoholes absolutos, dos xiloles y dos parafinas en una hora cada uno.

Criterios de Inclusión del grupo testigo o control

- a) Pacientes con presencia histológica, clínica y radiológica de carcinoma epidermoide de laringe, pero con epitelio de laringe libre de tumor.
- b) Pacientes con diagnóstico clínico, histológico y radiológico de lesiones premalignas de laringe (eritroplaquia, leucoplaquia) pero con epitelio libre de tumor.
- c) Pacientes sin presencia histológica, clínica y radiológica de cáncer epidermoide de laringe y/o lesiones premalignas, pero con lesiones inflamatorias (nódulos, pólipos) y epitelio sano de laringe.
- d) Pacientes sometidos a protocolo de estudio (microlaringoscopia de suspensión con toma de biopsia) para diagnóstico de alguna patología laringea.

Criterios de Exclusión del grupo problema y grupo control

- a) Pacientes que presenten otro diagnóstico histológico laringeo diferente al referido en los criterios de inclusión.
- b) Pacientes sin presencia de epitelio libre de carcinoma, lesión premaligna o proceso inflamatorio de laringe.
- c) Pacientes que presenten muestra histológica insuficiente.
- d) Pacientes que no cuentan con los estudios de laboratorio y/o gabinete necesarios para realizar el protocolo de estudio de patología laringea.
- e) Pacientes que no acepten la realización del protocolo de estudio.

MATERIAL Y METODOS

A los 53 pacientes incluidos en el estudio se le realizó lo siguiente (tabla3):

En el Departamento de Otorrinolaringología:

- 1) Historia clínica completa.
- 2) Los estudios de laboratorio completos.
- 3) Los estudios de gabinete (radiografía anteroposterior de tórax, tomografía lineal de cuello y tomografía computarizada de cuello).
- 4) Procedimiento quirúrgico (Microlaringoscopia directa de suspensión con toma de biopsia).

En el Departamento de Patología:

- 1) Las muestras de tejido enviadas se fijaron en formol al 10%.
- 2) Se procesaron en formol al 10% durante dos horas y posteriormente con dos alcoholes del 96%, dos alcoholes absolutos, dos xiloles y dos parafinas en una hora cada uno.

- 3) Se incluyeron bloques de parafina, se cortaron a 3 a 5 micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina.
- 4) Los cortes se estudiaron en microscopia óptica (con objetivo 10x, 20x 40x) para confirmar el diagnóstico histológico de lesión de laringe, ya sea mucosa sana, lesión inflamatoria, lesión premaligna o carcinoma epidermoide de laringe. En el caso de lesiones premalignas, se clasificaron en displasia leve, moderada y severa. En el caso de carcinoma se clasificó en carcinoma in situ, carcinoma microinvasor, carcinoma invasor y en el caso de carcinoma epidermoide, se clasificó en tres grados de diferenciación celular: bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado.

En el Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Unidad de Investigación:

Se utilizaron los siguientes anticuerpos

El anticuerpo policlonal de conejo anti β -catenina fue obtenido de Biotecnología Santa Cruz, Inc. (Santa Cruz, CA). Anticuerpo anti-conejo conjugado a biotina fue obtenido de la corporación DAKO (Dinamarca). El complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (DAKO corp. Dinamarca) fue usado.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido fueron tratados previamente con el buffer de citrato pH 6.2 un horno de microondas para incrementar la expresión de la β -catenina. Después de lavar, los cortes que contenían secciones del tejido fueron mantenidos en una solución HNC conteniendo 10 mM HEPES, cloruro de calcio 2 mM y cloruro de sodio 150 mM a pH 7.4. Los cortes fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos y después del lavado con buffer fosfatos, se colocaron en solución HCN conteniendo suero normal de cerdo al 2%. Los cortes de los tejidos fueron tratados con Triton X-100 al 0.5% (v/v) en HCN durante 30 minutos. Subsecuentemente, los cortes fueron incubados con anticuerpos anti β -catenina (dilución 1:100) por 90 minutos a 32 grados centígrados en ambiente húmedo. Los cortes fueron lavados en solución HCN y fueron incubados con anticuerpos anti-conejo unidos a biotina (dilución 1:800) por una hora en un compartimento húmedo. Después de realizar los lavados, los cortes fueron incubados con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (dilución 1:150) por 30 minutos en compartimento húmedo a 32 grados centígrados. Finalmente, el color fue desarrollado con tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno al 0.04% por 10 minutos. Como controles negativos, se emplearon cortes en duplicado en los cuales la exposición al anticuerpo primario fue omitido. Los cortes de tejido fueron teñidos con Hematoxilina Harris.

CRITERIO DE EVALUACIÓN

La localización celular y expresión de la β -catenina fue evaluada semicuatitativamente por 2 observadores. I) La localización fue clasificada como: membrana, citoplasma o negativa. II) El nivel de expresión fue clasificado como: fuerte, moderado, pobre o negativo.

Análisis estadístico

La correlación entre la localización y grado de expresión de la β -catenina y los datos histopatológicos fueron evaluados por la prueba de correlación de Spearman. La localización de β -catenina entre el carcinoma invasivo y no invasivo fue evaluado con la prueba exacta de Fischer. Los valores $P < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En el periodo comprendido de Enero a Diciembre del año 2000 se estudiaron un total de 53 pacientes los cuales 38 (71%) pacientes que constituyeron el grupo problema (diagnóstico de carcinoma epidermoide y/o lesiones premalignas de laringe) y 15 (29%) el grupo control (lesiones benignas, inflamatorias o mucosa sana de laringe). En la distribución del genero se observo claramente un predominio en el sexo masculino (90.6%) (figura 1B).

El promedio de edad fue de 63 años con una desviación estándar de 13 años con los rangos de 34 años minima y maxima de 8 años.

En 47 de los casos (88.7%) la localización de β -catenina estuvo en membrana mientras que en 6 casos (11.7%) se localizó en citoplasma (figura 1B). En epitelio normal la localización de β -catenina en membrana fue observada en el 100% de los casos (15 casos) figura 5A. El grado de expresión fue fuerte en 80% de los casos y moderado en el restante 20% (Tabla 2 y figuras 1A, 3B, 4B).

Respecto al carcinoma epidermoide de laringe, la β -catenina fue observada en la membrana celular en todos los casos bien y moderadamente diferenciados (figura 1A y 2A). En carcinomas pobremente diferenciados el 80% de los casos mostraron tinción en la membrana y 20% de los casos mostraron localización citoplasmática (figura 3A). En los carcinomas invasivos, el 100% de los casos mostraron localización citoplasmática de β -catenina (fig. 4A). No hubo correlación entre la localización de la β -catenina y el grado de

CRITERIO DE EVALUACIÓN

La localización celular y expresión de la β -catenina fue evaluada semicuatitativamente por 2 observadores. I) La localización fue clasificada como: membrana, citoplasma o negativa. II) El nivel de expresión fue clasificado como: fuerte, moderado, pobre o negativo.

Análisis estadístico

La correlación entre la localización y grado de expresión de la β -catenina y los datos histopatológicos fueron evaluados por la prueba de correlación de Spearman. La localización de β -catenina entre el carcinoma invasivo y no invasivo fue evaluado con la prueba exacta de Fischer. Los valores $P < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En el periodo comprendido de Enero a Diciembre del año 2000 se estudiaron un total de 53 pacientes los cuales 38 (71%) pacientes que constituyeron el grupo problema (diagnóstico de carcinoma epidermoide y/o lesiones premalignas de laringe) y 15 (29%) el grupo control (lesiones benignas, inflamatorias o mucosa sana de laringe). En la distribución del genero se observo claramente un predominio en el sexo masculino (90.6%) (figura 1B).

El promedio de edad fue de 63 años con una desviación estándar de 13 años con los rangos de 34 años minima y maxima de 8 años.

En 47 de los casos (88.7%) la localización de β -catenina estuvo en membrana mientras que en 6 casos (11.7%) se localizó en citoplasma (figura 1B). En epitelio normal la localización de β -catenina en membrana fue observada en el 100% de los casos (15 casos) figura 5A. El grado de expresión fue fuerte en 80% de los casos y moderado en el restante 20% (Tabla 2 y figuras 1A, 3B, 4B).

Respecto al carcinoma epidermoide de laringe, la β -catenina fue observada en la membrana celular en todos los casos bien y moderadamente diferenciados (figura 1A y 2A). En carcinomas pobremente diferenciados el 80% de los casos mostraron tinción en la membrana y 20% de los casos mostraron localización citoplasmática (figura 3A). En los carcinomas invasivos, el 100% de los casos mostraron localización citoplasmática de β -catenina (fig. 4A). No hubo correlación entre la localización de la β -catenina y el grado de

diferenciación del tumor (figura 3B). Diferencia estadísticamente significativa fue encontrada al comparar la localización de β -catenina en los carcinomas invasivos y no invasivos ($p < 0.01$).

En cuanto al grado de expresión de β -catenina, en carcinomas epidermoides bien diferenciados una tinción fuerte fue observada en el 72% de los casos (figura 1A), y expresión moderada fue encontrada en el 28% restante. En carcinomas moderados, expresión fuerte se encontró en 10% de los casos, una tinción moderada fue observada en 90% de los casos (figura 2A). En carcinoma pobremente diferenciado, 100% de los casos mostraron una débil expresión de β -catenina (figura 3A), aún en los casos donde β -catenina fue localizada en citoplasma. También en 100% de los carcinomas invasivos una tinción pobre a moderada fue observada (figura 4A). Se encontró correlación entre el grado de expresión de la β -catenina y el grado de diferenciación del carcinoma epidermoide de laringe ($p < 0.001$), $\rho = -0.784$.

El 68% de los pacientes con carcinoma epidermoide de laringe se estadificó homogéneamente en los grados III y IV, el grado de diferenciación tumoral mas frecuente fue el bien diferenciado 36%, mientras el moderadamente y poco diferenciado correspondieron al 27% y 27%.

Se correlaciono las variables grado de diferenciación tumoral y estadificación del cáncer aplicándose la prueba de correlación de Spearman para valorar su posible asociación estadística. El resultado que se obtuvo fue un valor $p = 0.91545$ con un coeficiente de correlación de -0.017701 , es decir no existe una asociación estadística (tabla 4).

Con un valor $p = 0.73510$ y un coeficiente de correlación 0.056437 se valoró la ausencia entre la estadificación tumoral y la intensidad de la expresión de la molécula β -catenina (Tabla 5).

Se confirmó la ausencia de dependencia entre la estadificación del carcinoma de laringe con respecto a la localización $p = 0.046646$ con un coeficiente de correlación 0.012111 (Tabla 6).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la β -catenina juega un papel dual, ya que participa: a) en las uniones adherentes manteniendo una adhesión célula-célula y b) a nivel nuclear, en la expresión de diferentes genes. Algunos autores han detectado a la β -catenina en núcleo o en citoplasma en diferentes tipos de cánceres. Esta redistribución se asocia a su potencial de translocación mediado por la vía de señalización Wnt. En los carcinomas de laringe, existen pocos estudios del complejo cadherina-cateninas. En este sentido, Andrews et al. (26) estudió carcinomas de epidermoide en cabeza y cuello (donde se incluyen 2 casos de carcinoma de laringe bien diferenciado y 4 casos de carcinoma de laringe pobremente diferenciado). Este grupo reporta pérdida de E-cadherina y β -catenina en membrana y aumento de su expresión en el citoplasma celular, este comportamiento no se modificó en carcinomas primarios ó en sus metástasis a ganglio. Con relación a la α -catenina, esta se expresó pobremente y no correlacionó con la expresión de E-cadherina o β -catenina. Hirvikoski (27), reportó distribución de la α -catenina en membrana y citoplasma en carcinomas de laringe. El porcentaje de tumores expresando tinción citoplásmica incrementó con relación a su desdiferenciación. En contraste con nuestros resultados que presentaron reducción de la expresión de la β -catenina, se asoció con pérdida de la diferenciación tumoral. Nuestros datos están de acuerdo con los estudios de Takayama et al (28) en cánceres de esófago, estómago y de colon. En carcinomas invasivos nuestros resultados indican redistribución de la β -catenina al citoplasma celular.

En otro aspecto, la reducción de adhesión célula-célula es un paso esencial en la progresión de malignización que conlleve a invasión vascular, del estroma y al proceso metastásico. Este fenómeno pudieran deberse, total o parcialmente, a una variedad de mecanismos que afectan el complejo cadherina-catenina.(9)

Recientemente una unión entre la señalización de integrina y la regulación en la adhesión celular mediada por cadherinas ha sido demostrada. Novaklk et al (29) reportaron que las integrinas, participando a través de la tirosín cinasa p59, puede causar reducción en la expresión de E-cadherina.

Ha sido indicado que la señalización intracelular debido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un importante regulador del complejo de adhesión mediado por el complejo E-cadherina-catenina. En este contexto, el EGFR induce la actividad de la tirosin cinasa que fosforila a la β -catenina y a la E-cadherina. Esta fosforilación causa disociación de estas moléculas, llevando a la redistribución de la β -catenina en el citoplasma celular. (35) Recientemente, Mizushima et al (36) demostró que la activación de EGFR no favorece la translocación de β -catenina al núcleo.

En carcinomas epidermoides algunos reportes han indicado la sobre expresión de EGFR (30-33). Grands y Tweardy (34) reportaron niveles elevados de RNA mensajero para

el factor transformante del crecimiento- α y para EGFR, los cuales pueden ser empleados como marcadores tempranos en la carcinogenesis en el cáncer de cabeza y cuello.

Nuestros datos indican una disfunción de la β -catenina causada por una reducción de la expresión en membrana en los carcinomas epidermoides de laringe. Sin embargo, no detectamos tinción nuclear de β -catenina. Podríamos sugerir que este comportamiento sugiere un aumento en la degradación de la β -catenina. En cambio, en células con características invasivas, la sobre expresión de la β -catenina puede ser debido a una alteración en el proceso de degradación por el complejo APC/GS3KB-axina o a alteración en una o varias de las vías de señalización antes indicadas, las cuales pudieran estar participando en la redistribución de la β -catenina (figura C).

Estas posibilidades pueden estar asociadas a la inestabilidad genética que se encuentra aumentada durante la progresión del tumor.

Finalmente, nuestros resultados implican una elevación de la habilidad potencial de las células cancerígenas a dispersarse, paso temprano de la invasión local.

Por otra parte, nuestro trabajo no mostró alguna correlación entre estadificación, grado de diferenciación tumoral con expresión de la molécula de β -catenina o localización de la misma.

El conocimiento en la regulación del sistema cadherina-catenina es imprescindible para la prevención o tratamiento del carcinoma de laringe.

CONCLUSIÓN

Nosotros demostramos alteraciones en la expresión de beta-catenina en carcinomas epidermoides de laringe se asocia con menor grado de diferenciación tumoralla cual prodría favorecer una disminución en adhesión intercelular promoviendo el comportamiento invasivo y metastásico del tumor. Otros estudios se necesitarán para definir la participación de la β -catenina ya que no se observó localización nuclear de β -catenina, es probable que otras vías de señalización además de la WNT participen en los mecanismos asociados para la transformación maligna del carcinoma de laringe.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey BJ, Head and Neck Surgery- Otolaryngology, 3rd. edition, 2002, pag 1530-1545.
2. Reporte de 1999 mortalidad, Coordinación general de planeación estratégica, dirección general de información y evaluación del desempeño, Secretaría de salud México, 45-48.
3. McGuirt W. Frederic MD. Conceptos actuales en el Cáncer Laríngeo, primera parte. Clínicas Otorrinolaringológicas de Norteamérica 1997; 1: 1-57.
4. Bruckner K, Klein R 1998 signaling by Eph receptors and their ligans. *Curr Opin. Neurobiol.* 8:375-82.
5. Culotti JG, Merz DC 1998. DCC and netrins, *Curr Opin Cell Biol.* 10, 609-13.
6. Yu HH, Kolodkin AL. 1999, Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22: 11-14.
7. Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1607-1620.
8. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 992-1005.
9. Morin PJ, Sparks AB, Korined V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-1790.
10. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, et al. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275: 1790-1792.
11. Jockush BM, Bubck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J et al 1995. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev. cell Dev. Biol* 11: 379-416.
12. Hynes RO 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9: M33-37
13. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998, Signal transductin and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50:197-263.
14. Iofus JC, Liddington RC. 1997. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 99: 2302-6
15. Humphries MJ, Newham P. 1998 The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 8:78-83.
16. Vaugn DE, Bjorkman PJ. 1996. The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 16: 261-73.
17. Crossin KL, Krushel LA. 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn* 218: 260-279.
18. Bretscher A. 1999. regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:109-16.
19. Lasky LA. 1995. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 64:113-39.
20. Springer TA 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev Physiol.* 57:827-72.

21. Hartwell DW, Wagner DD. 1999. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb. Haemost.* 82:850-57.
22. Varki A. 1997. Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *J. clin Invest.* 99:158-62.
23. Yang J, Furie BC, Furie B. 1999. The biology of P selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counter receptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Throm. Haemost.* 81:1-7.
24. Pavalko FM, Walker DM, Graham L, Goheen M, Doerschyk CM, Kansas GS. 1995. The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actin. *J. Cell Biol.* 129:1155-64
25. Chung CK, Stryker JA, Abot AB, et al. Histologic grading in the clinical evaluation of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol* 1980; 106:623-624.
26. Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, et al. Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *Br J Cancer* 1997; 75: 1474-1480.
27. Hirvikoski P, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, et al. Cytoplasmic accumulation of α -catenin is associated with aggressive features in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998; 79: 546-550.
28. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, et al. β -Catenin expression in human cancers. *Amer J Pathol* 1996; 148: 39-46.
29. Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, et al. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β -catenin signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4374-4379.
30. Resnick MJ, Uhlman D, Niehans GA, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 685-694.
31. Scambia G, Panici P, Battaglia F, et al. Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors. *Cancer* 1991; 67: 1347-1351.
32. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist HB. Expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal dysplasia and carcinoma. *Acta Otolaryngol* 1990; 110: 309-313.
33. Christensen ME, Therkildsen MH, Poulsen SS, et al. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in laryngeal carcinomas demonstrated by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 1993; 113: 563-567.
34. Grands JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579-3584.
35. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, et al. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996; 77(suppl.): 1605-1613.
36. Mizushima T, Nakagawa H, Kamberov YG, et al. Wnt-1 but not epidermal growth factor induces β -catenin/T-cell factor-dependent transcription in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 277-282.

TABLA 1
LOCALIZACIÓN β -CATENINA
PORCENAJES(casos)

Tejido	membrana	citoplasma	negativo
Epitelio normal	100%(15)	-	-
Bien diferenciado	100%(14)	-	-
Moderadamente diferenciado	100%(10)	-	-
Pobremente diferenciado	80%(8)	20%(2)	
Carcinoma invasivo	-	100%(4)	-

TABLA 2
EXPRESIÓN β -CATENINA
PORCENAJES(casos)

Tejido	Fuerte	Moderado	Débil
Epitelio Normal	80%(12)	20%(3)	-
Bien Diferenciado	72%(10)	28%(4)	-
Moderadamente Diferenciado	10%(1)	90%(9)	-
Pobrementemente diferenciado	-	-	100%(10)
Carcinoma invasor	-	50%(2)	50%(2)

TABLA 3 Casos β -catenina en carcinoma epidermoide de laringe

No Caso	Caso Qx	Diagnostico	Membrana	Citoplasma
1	301-97	CA BD	+++	-
2	1030-97	CA BD	++	-
3	1047-92	CA BD	++	-
4	940-00	CA BD	++	-
5	416-00	CA BD	+++	-
6	473-00	CA BD	+++	-
7	1048-91	CA BD	+++	-
8	1081-91	CA BD	+++	-
9	182-92	CA BD	+++	-
10	952-91	CA BD	++	-
11	150-00	CA BD	+++	-
12	878-94	CA BD	+++	-
13	199-94	CA BD	+++	-
14	473-00	CA BD	+++	-
15	314-93	CA MD	++	-
16	832-97	CA MD	++	-
17	1030-97	CA MD	++	-
18	220-00	CA MD	++	-
19	344-92	CA MD	+++	-
20	150-00	CA MD	++	-
21	763-94	CA MD	++	-
22	1284-97	CA MD	++	-
23	74-97-3	CA MD	++	-
24	756-94	CA MD	++	-
25	301-97	CA PD	+	+
26	1217-96	CA PD	+	-
27	314-93	CA PD	+	-
28	832-97	CA PD	+	+
29	1030-97	CA PD	-	+
30	661-00	CA PD	-	+
31	416-00	CA PD	+	-
32	953-00	CA PD	+	-
33	473-00	CA PD	+	+
34	1061-93	CA PD	-	+
35	242-97	INV	-	++
36	220-00	INV	-	+
37	416-00	INV	-	+
38	150-00	INV	-	++
39	1217-96	NORMAL	+++	-
40	314-93	NORMAL	+++	-
41	6-90-2	NORMAL	+++	-
42	242-92	NORMAL	++	-
43	1012-00	NORMAL	+++	-
44	260-00	NORMAL	+++	-
45	473-00	NORMAL	++	-
46	701-00	NORMAL	+++	-
47	416-00	NORMAL	+++	-
48	697-00	NORMAL	+++	-
49	701-00	NORMAL	+++	-
50	917-00	NORMAL	+++	-
51	48-00	NORMAL	+++	-
52	1055-00	NORMAL	+++	-
53-00	958-00	NORMAL	+++	-

TABLA 4
Estadificación del carcinoma epidermoide de laringe y grado de diferenciación

	I	II	III	IV	TOTAL
Carcinoma Poco diferenciado	1 (2.6%)	2 (5.2%)	4 (10.5%)	3 (7.8%)	10 (26.3%)
Carcinoma Moderadamente diferenciado	1 (2.6%)	3 (7.8%)	4 (10.5%)	2 (5.2%)	10 (26.3%)
Carcinoma bien diferenciado	2 (5.2%)	2 (5.2%)	5 (13.1%)	5 (13.1%)	14 (36.8%)
Carcinoma invasor	-	1 (2.6%)	2 (5.2%)	1 (2.6%)	4 (10.5%)
TOTAL	4 (10.5%)	8 (21.2%)	15 (39.4%)	11 (28.9%)	38 (100%)

TABLA 5
Estadificación del carcinoma epidermoide de laringe e intensidad de β -catenina

	I	II	III	IV	TOTAL
FUERTE	2 (5.2%)	3 (7.8%)	3 (7.8%)	3 (7.8%)	11 (28.9%)
MODERADO	1 (2.6%)	2 (5.2%)	7 (18.4%)	5 (13.1%)	15 (39.4%)
DEBIL	1 (2.6%)	3 (7.8%)	5 (13.1%)	3 (7.8%)	12 (31.7%)
TOTAL	4 (10.5%)	8 (21.2%)	15 (39.4%)	11 (28.9%)	38 (100%)

TABLA 6
Estadificación del carcinoma epidermoide de laringe y localización de β -catenina

	I	II	III	IV	TOTAL
MEMBRANA	4 (10.5%)	7 (18.4%)	12 (31.5%)	9 (23.6%)	32 (84.3)%
CITOPLASMA	-	1 (2.6%)	3 (7.8%)	2 (5.2%)	6 (15.7%)
TOTAL	4 (10.5%)	8 (21%)	15 (39.6%)	11 (28.9%)	38 (100%)

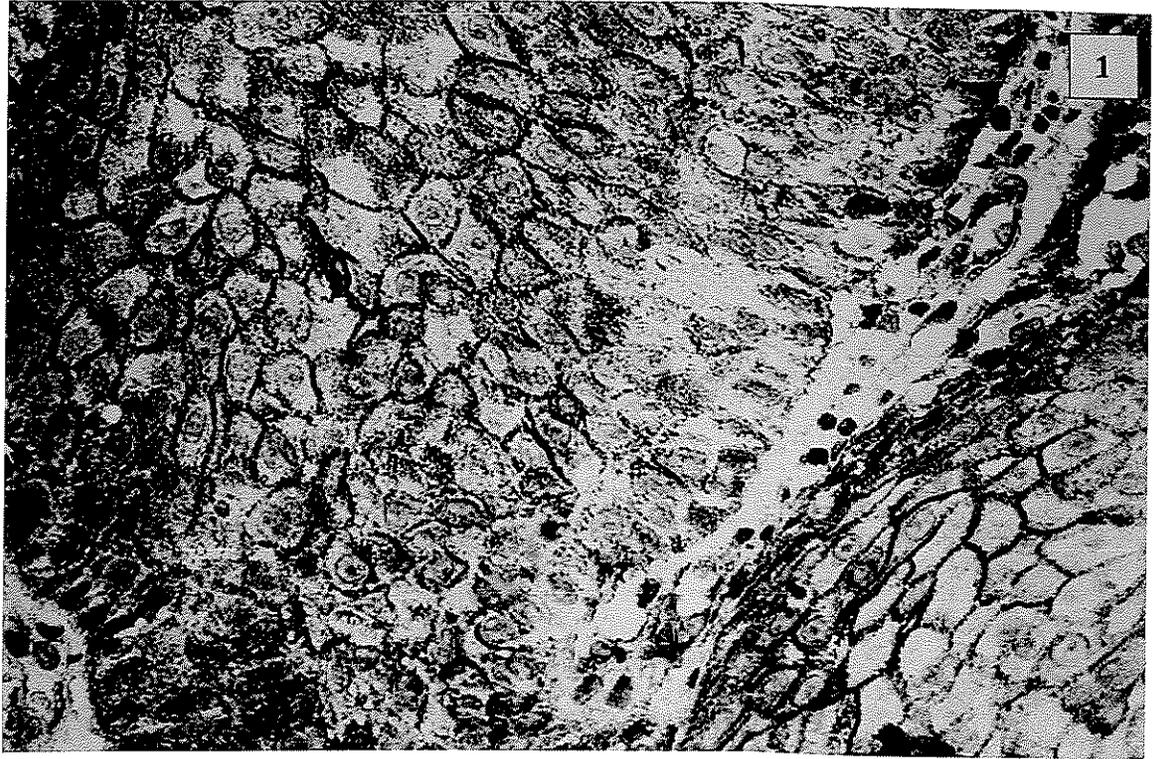


FIGURA 1A
Carcinoma bien diferenciado expresando
fuerte tinción en membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

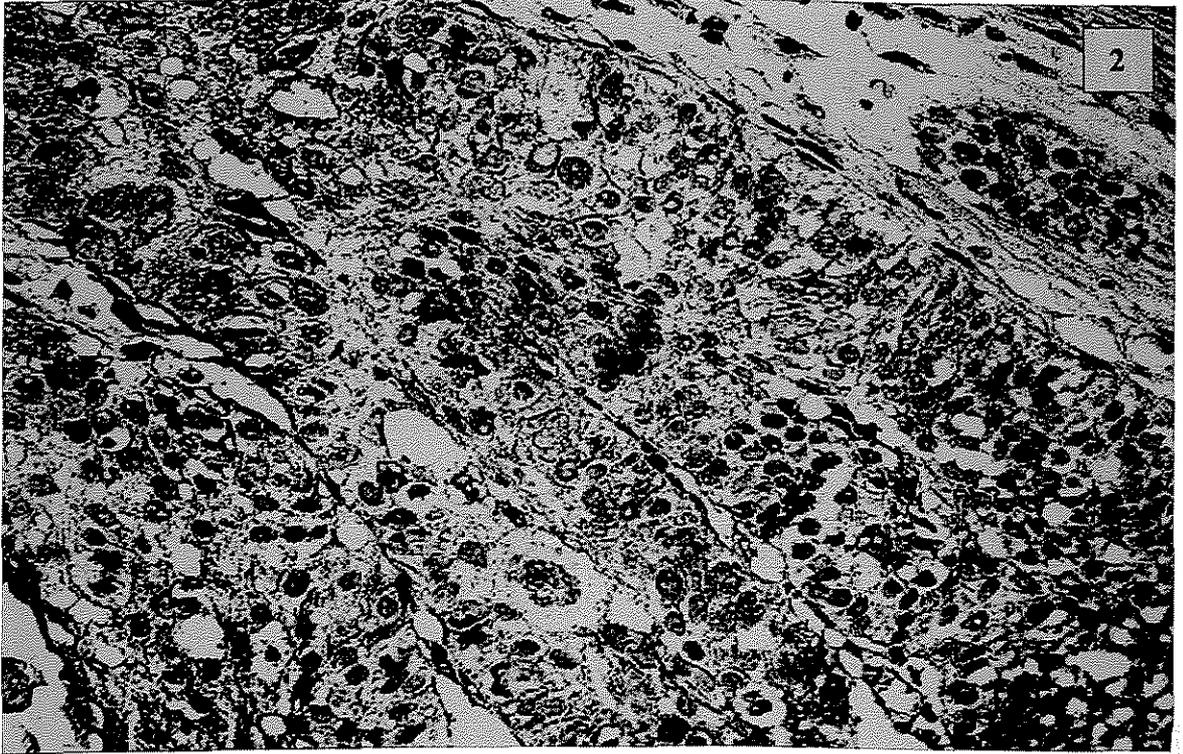


FIGURA 2A
Carcinoma moderadamente diferenciado
expresando moderada expresión en
membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

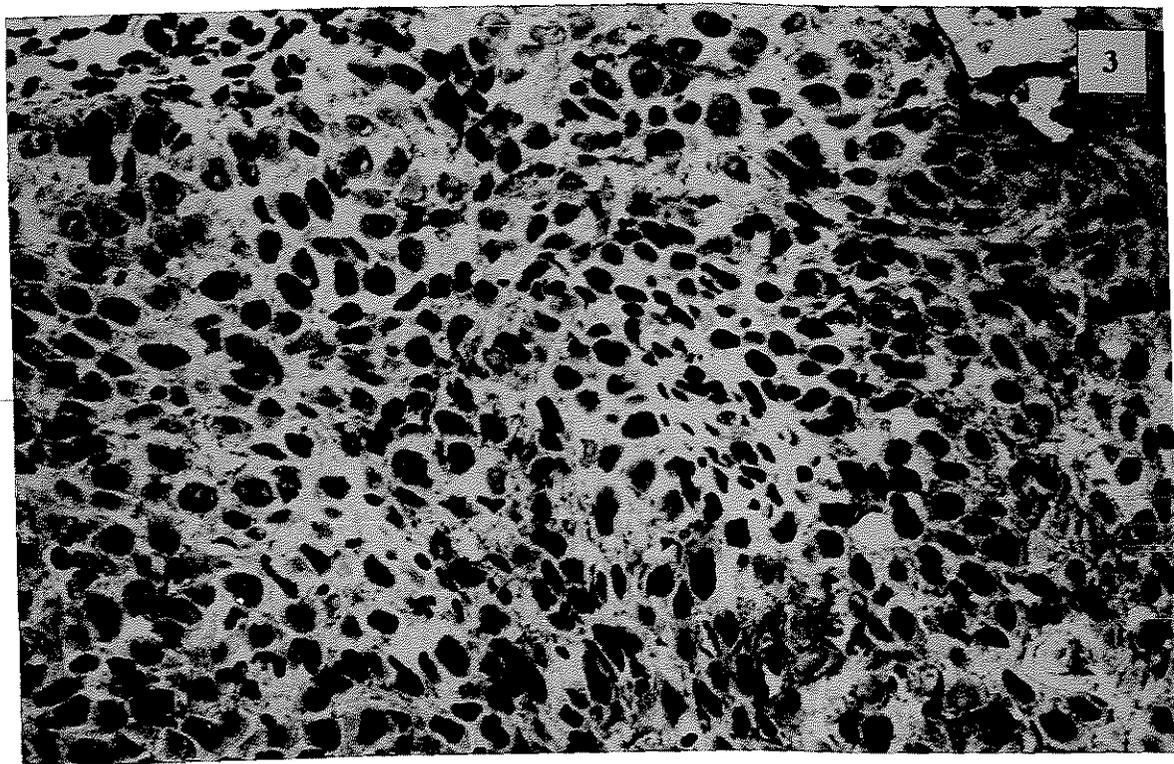


FIGURA 3A
Carcinoma pobremente diferenciado
expresando debil tinción en membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

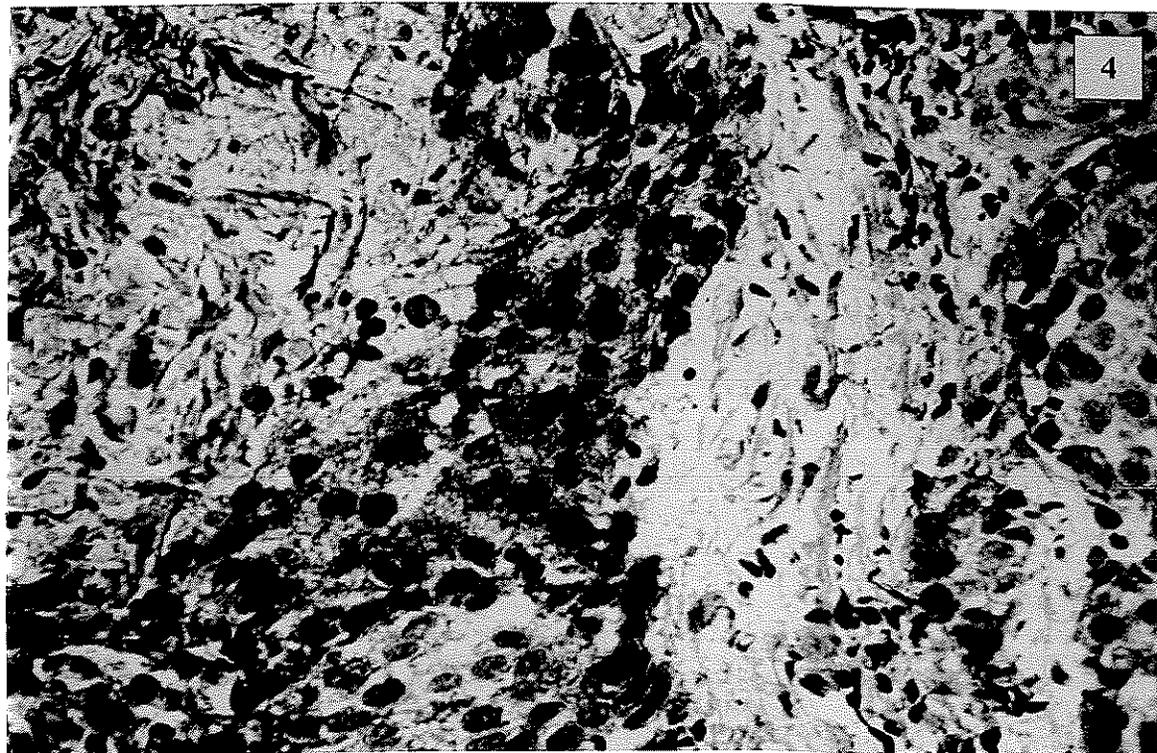


FIGURA 4A
Carcinoma invasor expresando moderada
tinción en citoplasma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

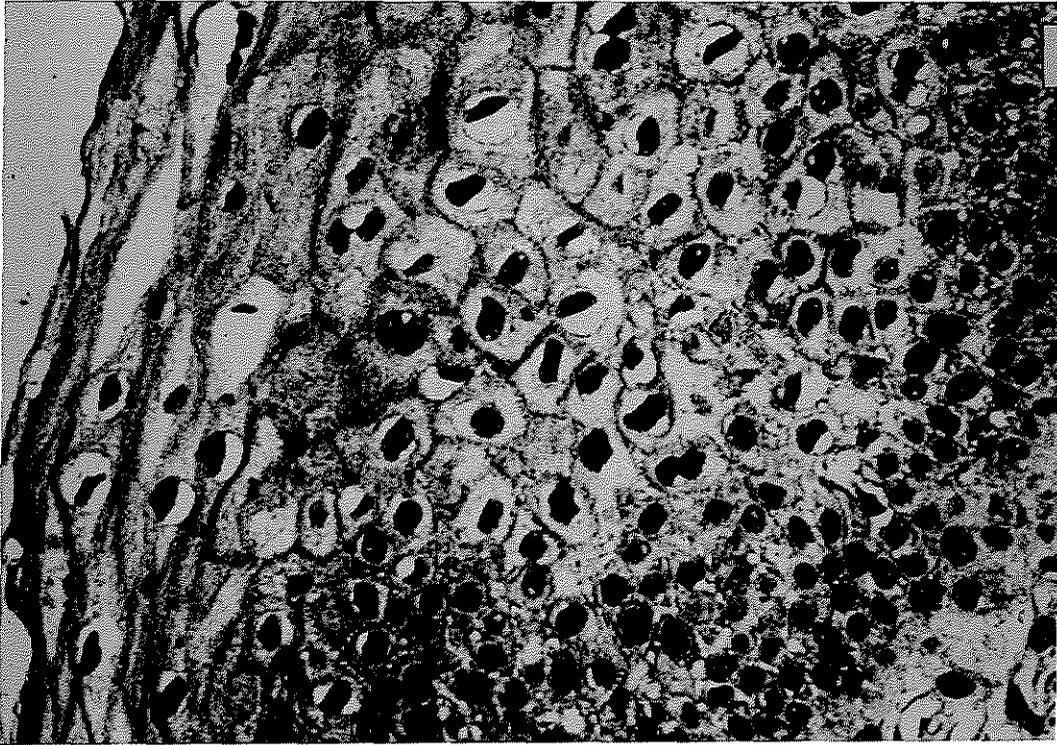


FIGURA 5A
Epitelio normal mostrando una fuerte
expresión en membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

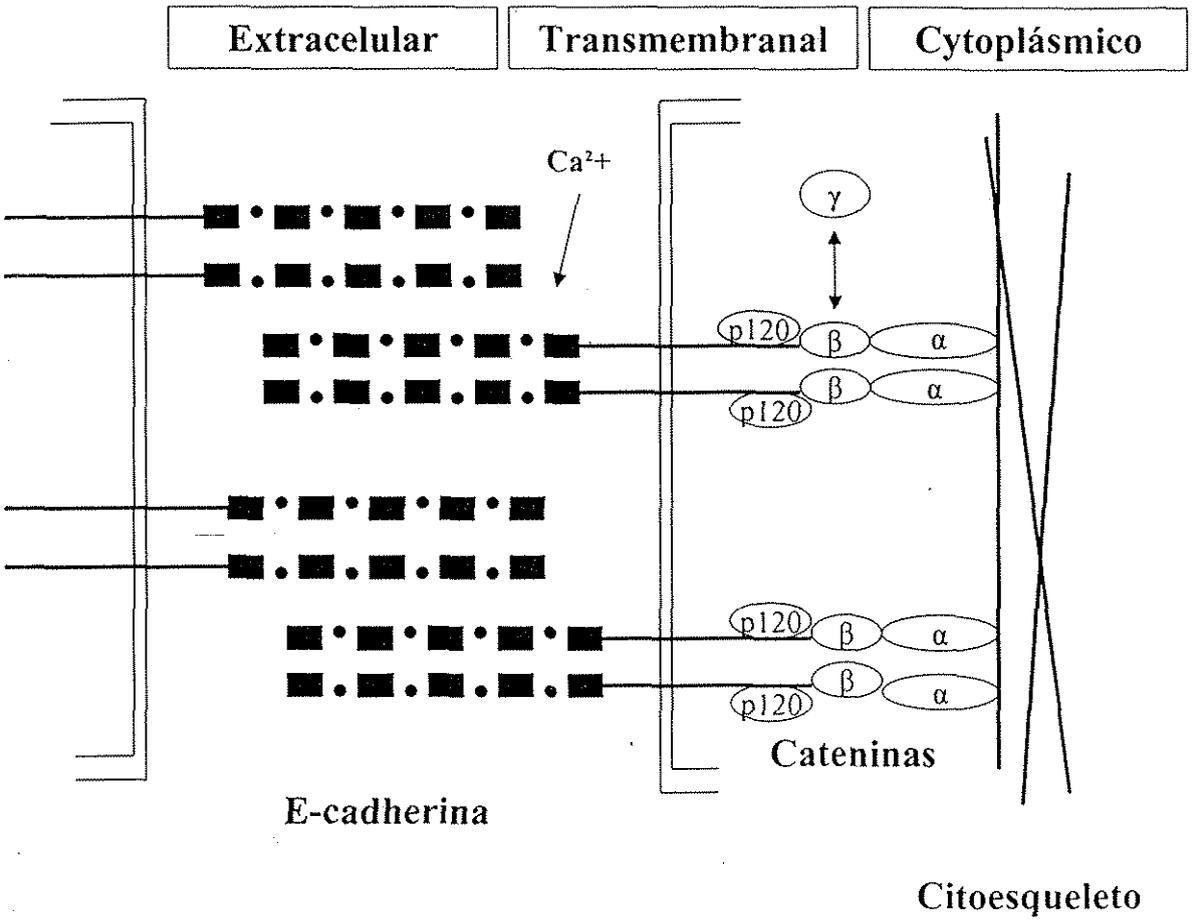


FIGURA A

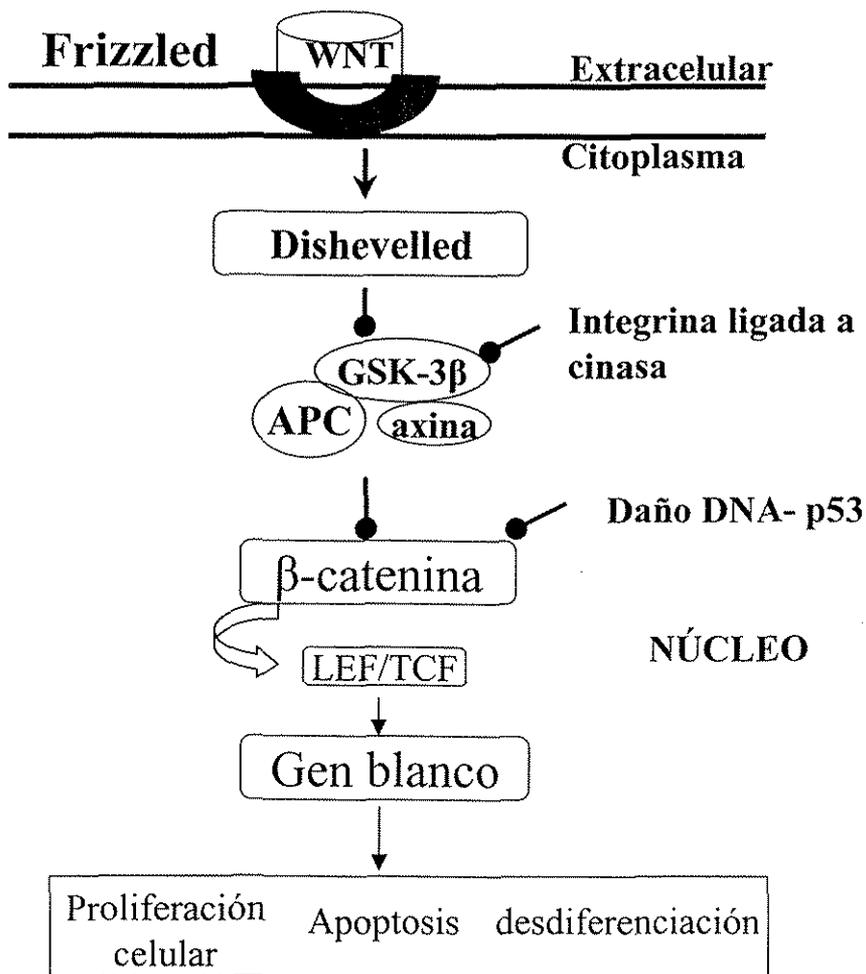


Figura B

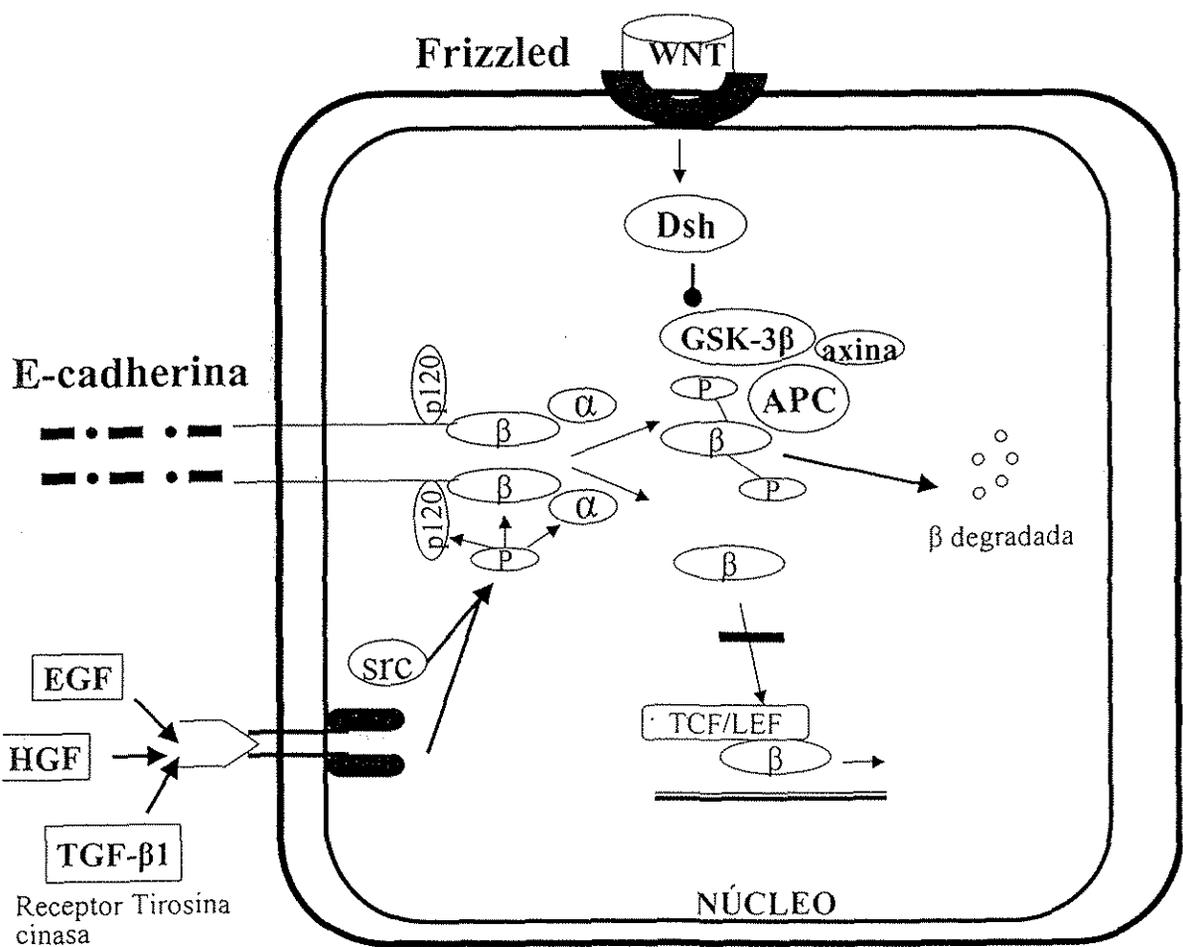


FIGURA C

DISTRIBUCIÓN DE GÉNERO

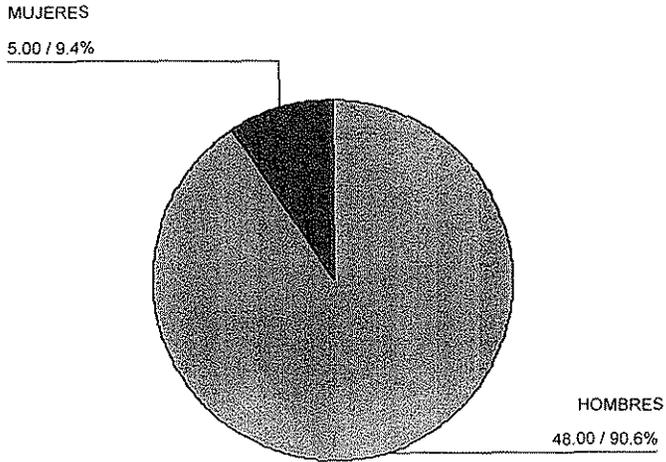


FIGURA 1B

LOCALIZACIÓN CELULAR DE BETA-CATENINA

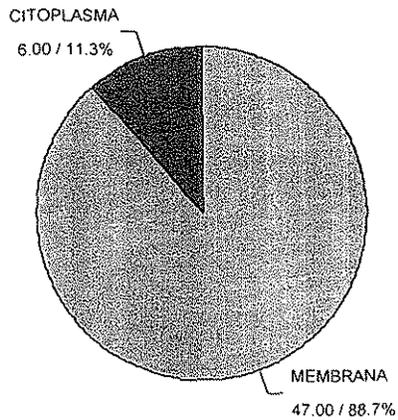
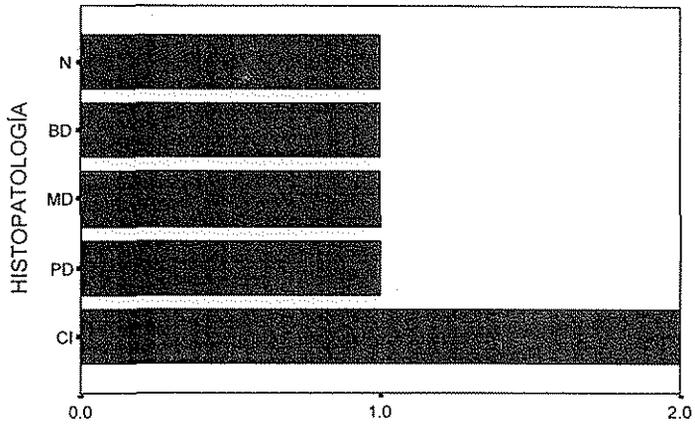


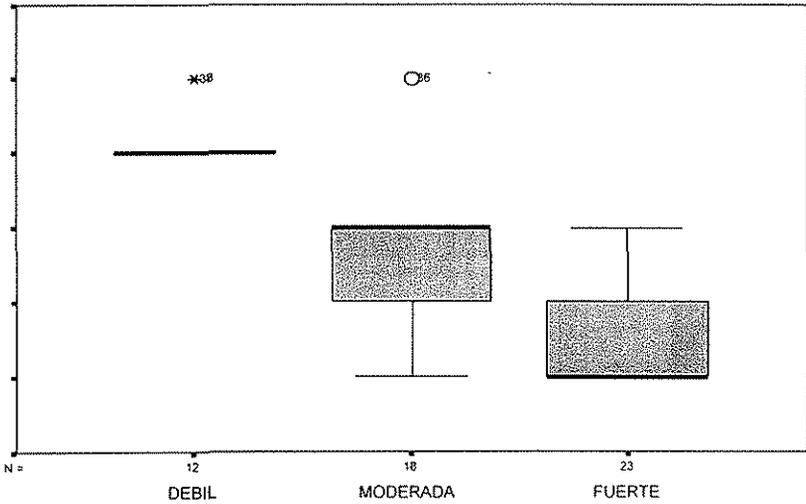
FIGURA 2B



LOCALIZACIÓN DE BETA-CATENINA

1= MEMBRANA
2= CITOPLASMA

FIGURA 3B



EXPRESIÓN DE BETA-CATENINA

FIGURA 4B