

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE BIOANALISIS  
CARRERA DE HISTOCITOLOGIA**

**DISERTACION PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO  
HISTOCITOLOGO**

“DETERMINACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN  
FLUORESCENTE IN SITU (FISH) EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON  
CARCINOMA DE PULMÓN ATENDIDOS EN EL HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARÍN  
2011 Y 2012”

**NOMBRE DEL ESTUIANTE**

JUAN SEBASTIÁN LÓPEZ VÁSQUEZ

**NOMBRE DEL DIRECTOR**

MSc: NORA ALBORNOZ

QUITO 2014

PARA GRADOS ACADEMICOS DE HISTOCITOLOGO (TERCER NIVEL)

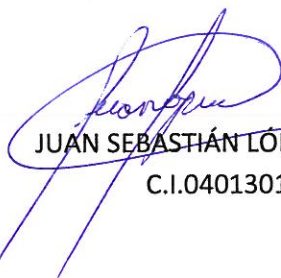
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR

DECLARACION Y AUTORIZACIÓN

Yo **JUAN SEBASTIÁN LÓPEZ VÁSQUEZ**, C.I. 0401301965 autor del trabajo de grado titulado: **“DETERMINACIÓN DE LA SOBREENEXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH) EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON CARCINOMA DE PULMÓN ATENDIDOS EN EL HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARÍN 2011 Y 2012”** previa a la obtención del grado académico de **HISTOCITOLOGO** en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de Conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito 1 de Septiembre del 2014



JUAN SEBASTIÁN LÓPEZ VÁSQUEZ

C.I.0401301965

## **DEDICATORIA**

A mi familia y amigos

## **AGRADECIMIENTOS**

A la escuela de Bioanálisis y en especial a los docentes de la carrera de histocitología por los conocimientos impartidos durante mi carrera universitaria, al Hospital Carlos Andrade Marín por el apoyo brindado para el desarrollo de mi investigación, a mis compañeros y amigos por el apoyo y consejos que me impartieron durante la realización de la investigación, y agradezco infinitamente a Dios y a mis padres con el apoyo en los momentos difíciles para salir adelante.

## Contenido

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIA .....   | I    |
| AGRADECIMIENTOS.....  | II   |
| RESUMEN.....  | VI   |
| ABSTRACT .....  | VIII |
| CAPITULO I.....   | 1    |
| 1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACION.....                            | 2    |
| 1.2 JUSTIFICACIÓN.....  | 2    |
| 2. OBJETIVOS .....  | 3    |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL .....                                    | 3    |
| 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....                                  | 3    |
| 3. HIPÓTESIS .....  | 3    |
| 3.1 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....                     | 3    |
| CAPÍTULO II .....   | 5    |
| 4. MARCO TEÓRICO.....   | 5    |
| 4.1 EPIDEMIOLOGIA .....                                       | 5    |
| 4.2 PULMÓN.....   | 5    |
| 4.3 PATOLOGÍAS .....  | 10   |
| 4.3.1 ADENOCARCINOMA DE PULMÓN .....                          | 11   |
| 4.3.2 CARCINOMA ESCAMOSO .....                                | 13   |
| 4.3.3 CARCINOMA DE CÉLULAS GIGANTES.....                      | 14   |
| 4.3.4 CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS .....                     | 15   |
| 4.3.5 MECANISMO MOLECULAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR .....      | 16   |
| 4.4 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)..... | 19   |
| 4.4.1 GENERALIDADES.....                                      | 19   |
| 4.4.2 ESTRUCTURA DEL EGFR .....                               | 19   |
| 4.4.3 ACTIVACION DEL EGFR .....                               | 20   |
| 4.4.4 EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN .....                          | 21   |
| 4.4.5 DETECCIÓN DEL GEN DEL EGFR .....                        | 23   |
| CAPÍTULO III .....  | 25   |
| 5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....                                  | 25   |
| 5.1 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH) .....             | 25   |

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO IV .....   | 28 |
| 6. MARCO METODOLÓGICO.....  | 28 |
| 6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....  | 28 |
| 6.2 POBLACIÓN Y/O MUESTRA .....   | 28 |
| 6.3 SISTEMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS<br>.....              | 28 |
| 6.3.1 OBTENCIÓN DE DATOS.....   | 28 |
| 6.3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO .....                                 | 29 |
| 6.3.3 TÉCNICA DEL FISH: .....   | 29 |
| 6.4 ASPECTOS ETICOS .....   | 31 |
| 6.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....  | 31 |
| 6.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....   | 32 |
| 6.7 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....   | 32 |
| 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 32 |
| CAPÍTULO V .....  | 34 |
| 7. RESULTADOS.....  | 34 |
| 7.1 GÉNERO.....   | 34 |
| 7.2 EDAD .....  | 35 |
| 7.3 HABITO TABAQUICO.....   | 36 |
| 7.5 ANTECEDENTES FAMILIARES .....   | 37 |
| 7.6 TIPO DE CANCER .....  | 38 |
| 7.7 DIAGNÓSTICOS DE SOBREENPRESIÓN DEL EGFR MEDIANTE FISH.....                          | 39 |
| 7.8 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR TIPO DE<br>CANCER.....        | 40 |
| 7.9 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR<br>EIDADES .....              | 41 |
| 7.10 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR<br>GÉNERO .....              | 42 |
| 7.11 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR<br>HABITO TABAQUICO .....    | 43 |
| 7.12 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR<br>ANTECEDENTE FAMILIAR..... | 44 |
| 8. DISCUSIÓN.....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....          | 48 |
| 9.1 CONCLUSIONES.....                           | 48 |
| 9.2 RECOMENDACIONES.....                        | 48 |
| 10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA Y PÁGINAS WEB..... | 50 |
| 10.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....            | 50 |
| 10.2 PÁGINAS WEB.....                           | 52 |
| 11. ANEXOS.....                                 | 54 |
| 11.1 EQUIPOS UTILIZADOS PARA MICROARREGLOS..... | 54 |
| 11.2 MICROARREGLOS PARA ESTUDIO.....            | 55 |
| 11.4 REPORTE DE RESULTADOS DE LA TECNICA.....   | 58 |
| 11.5 RESULTADOS POSITIVOS DE LA TECNICA.....    | 59 |
| 11.6 RESULTADOS NEGATIVOS DE LA TECNICA.....    | 60 |
| 11.7 INSERTO DE LA TECNICA.....                 | 61 |

## RESUMEN

Las neoplasias malignas de pulmón son el resultado del aumento continuo de la proliferación celular sin regulación, y en posterior la invasión de las células neoplásicas hacia otra parte del organismo, los carcinomas de pulmón son neoplasias malignas siendo estas las más comunes que se encuentran en el Ecuador de tal manera que el diagnóstico de citogenética molecular es de gran importancia.

El estudio y diagnóstico de la sobreexpresión del Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico (EGFR) cumple un papel importante en la detección molecular de este gen mediante la técnica de FISH.

La hibridación in situ fluorescencia (FISH) es una técnica utilizada y validada hace varias décadas en el área de citogenética molecular la cual es considerada como un estándar de oro en el diagnóstico, para la selección de los pacientes que requieren un tratamiento personalizado.

La sobreexpresión del Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico (EGFR) de acuerdo a múltiples estudios, tiene una gran importancia pues con los diagnósticos realizados por FISH ayudan a seleccionar un mejor tratamiento para el cáncer de pulmón así como también de otros órganos.

El presente estudio investigativo tiene por objeto determinar la sobreexpresión del Receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico (EGFR) en pacientes que sufren carcinomas epiteliales de pulmón como son el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso, el carcinoma de células pequeñas, y el carcinoma de células grandes, mediante la técnica de FISH. Para el efecto se realizó un estudio cuasi experimental descriptivo y retrospectivo en biopsias bronquiales de pacientes que fueron atendidos en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) en el año 2011 y 2012., empleando una muestra total a 120 pacientes en ambos años que acudieron al hospital atenderse por cáncer de pulmón, de los cuales se descartaron a 21 pacientes por ausencia de bloques y datos clínicos, con una muestra final de 99 casos.

Los casos incluidos en el estudio fueron registrados en una matriz estructurada que incluyó: género, edad del paciente, hábito tabáquico, y antecedentes familiares los diagnósticos de la sobreexpresión del EGFR.

En el análisis estadístico general de 99 casos el 43% con un  $p = 0.01$  dio positivo para la sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH

En 37 casos (37,4%,  $p = 0,01$ ) se evidenciaron la sobreexpresión de EGFR en pacientes con Adenocarcinoma, en 3 casos (3%,  $p = 0,01$ ) tenían sobreexpresión de EGFR en carcinomas escamosos, en 4 casos (4%,  $p = 0.01$ ) se encontró la sobreexpresión de EGFR en carcinomas de células pequeñas y en carcinomas de células grandes no se observaron casos positivos

Se encontraron 19 casos (19%) entre los 61 y 70 años de edad.

En la investigación se determinó que 24 casos (24,2%,  $p = 0,01$ ) de sexo femenino se encontró la sobreexpresión del EGFR, en tanto 19,2 casos (19%,  $p = 0,01$ ) son de sexo masculino.

En el estudio 28 casos (28,3%,  $p = 0,01$ ) son pacientes fumadores con sobreexpresión de EGFR mientras el 15 casos (15,2%  $p = 0,01$ ) son de no fumadores.

Por su parte los antecedentes familiares en 40 casos 8 (40,2%,  $p = 0,01$ ) los cuales los pacientes no tenían ningún antecedente familiar tuvo una sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH

En el presente análisis, ayudo para establecer que la técnica de FISH para la sobreexpresión del EGFR de pacientes que sufren cáncer de pulmón es una buena herramienta para el estudio de sobreexpresión de cualquier gen que se desee hacer en el Hospital Carlos Andrade Marín.

Palabras clave: sobreexpresión, EGFR, FISH, cáncer de pulmón.

## ABSTRACT

The malignant neoplasias of lung are the result of the constant increase of the cellular proliferation without regulation, and in later the invasion of the cells neoplásicas towards another part of the organism, the carcinomas of lung are neoplasias malignant being these more common than they find in the Ecuador in such a way that the diagnosis of citogenética molecular performs great importance.

The study and diagnosis of the sobreexpresión of the Epidermal growth factor receptor (EGFR) fulfills an important paper in the molecular detection of this gene by means of FISH's technology.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is an used and validated technology several decades ago in the area of citogenética molecular which is considered to be a golden standard in the diagnosis, for the selection of the patients who need a personalized treatment.

The sobreexpresión of the Epidermal growth factor receptor (EGFR) of agreement to multiple studies, has a great importance since with the diagnoses realized by FISH they help to select a better treatment for the cancer of lung as well as also of other organs.

The present study investigativo has for object determine the sobreexpresión of the Epidermal growth factor receptor (EGFR) in patients who suffer carcinomas epiteliales of lung since are the adenocarcinoma, the scaly carcinoma, the carcinoma of small cells, and the carcinoma of big cells, by means of FISH's technology. For the effect a study was realized cuasi experimentally descriptively and retrospectively in patients' bronchial biopsies that were attended in the Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) in the year 2011 and 2012., using a total sample to 120 patients in both years that came to the hospital to be attended by cancer of lung, of which they rejected 21 patients for absence of blocks and clinical information, with a final sample of 99 cases.

The cases included in the study were registered in a structured counterfoil that it included: kind, age of the patient, habit tabáquico, and familiar precedents the diagnoses of the sobreexpresión of the EGFR.

In the statistical general analysis of 99 cases 43 % with one  $p = 0.01$  gave positive for EGFR's sobreexpresión by means of FISH's technology

In 37 cases (37,4 %,  $p = 0,01$ ) EGFR's sobreexpresión was demonstrated in patients by Adenocarcinoma, in 3 cases (3 %,  $p = 0,01$ ) had sobreexpresión of EGFR in scaly carcinomas, in 4 cases (4 %,  $p = 0.01$ ) EGFR's sobreexpresión was in carcinomas of small cells and in carcinomas of big cells positive cases were not observed

They found 19 cases (19 %) between 61 and 70 years of age.

In the investigation one determined that 24 cases (24,2 %,  $p = 0,01$ ) of feminine sex the sobreexpresión of the EGFR was, while 19,2 cases (19 %,  $p = 0,01$ ) are of masculine sex.

In the study 28 cases (28,3 %,  $p = 0,01$ ) are smoking patients with sobreexpresión of EGFR while 15 cases (15,2 %  $p = 0,01$ ) are of not smoking.

For your part the familiar precedents in 40 cases 8 (40,2 %,  $p = 0,01$ ) which the patients did not have any familiar precedent it had EGFR's sobreexpresión by means of FISH's technology

In the present analysis, I help to establish that FISH's technology for the sobreexpresión of the patients' EGFR that they suffer cancer of lung is a good tool for the study of sobreexpresión of any gene that Carlos Andrade Marín wants him to do in the Hospital.

Key words: sobreexpresión, EGFR, FISH, cancer of lung.

## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón ocupa uno de los primeros lugares entre las enfermedades malignas en el Ecuador con una baja supervivencia y posee un incremento de casos en mujeres y en un mayor porcentaje en hombres. En los últimos años ha aumentado un 12%. El Registro Nacional de Tumores del 2009 publicado por SOLCA indica que el promedio de casos por año se ha incrementado, de los años comprendidos entre el 2003 y el 2005 de 28 pacientes a 58 en el caso hombres y de 17 a 34 para las mujeres. (Patricia Cueva, junio 2009)

Las posibles causas del cáncer de pulmón son: el aumento del tabaquismo temprano, enfermedades crónicas y autoinmunes, factores genéticos y ambientales y el problema más importante en esta patología se da porque es diagnosticado en niveles tardíos ya que no existe un screening adecuado por lo que el diagnóstico resulta más difícil para los médicos patólogos y la supervivencia no es mayor a 5 años. (Patricia Cueva, junio 2009)

La técnica de FISH es una de las destrezas de la citogenética molecular la cual ha tenido un amplio desarrollo en los últimos años para la detección de genes los cuales están tanto como en neoplasias y enfermedades genéticas. Este tipo de técnicas de análisis han ayudado en el diagnóstico de enfermedades, las mismas que son difíciles de detectar por los métodos convencionales. (José Javier Gómez, octubre 2011)

El avance de la tecnología ha hecho posible disponer de herramientas y técnicas para la detección y posterior tratamiento para el cáncer pulmonar; en el área de citogenética molecular la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) permite la detección de Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR) el cual es un gen de la familia de los receptores de quinasas, el cual está localizado en la membrana citoplasmática y que se sobre expresa en algunos tipos de cáncer pulmonar como el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma escamoso y sus variantes. (José Javier Gómez, octubre 2011)

En el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) de la ciudad de Quito en el laboratorio de patología se ha detectado este gen a través de la tinción de inmunohistoquímica (IHQ), esta reacción y lectura es variable debido a la dificultad de establecer los límites para diferenciar el positivo del negativo por la interpretación del observador para el diagnóstico de la sobreexpresión del EGFR. (Vaquero & Manuel, 2013)

Debido a esto, en el HCAM y con la ayuda de la empresa ROCHE, se realiza la detección del gen EGFR mediante la técnica de PCR para observar los pleomorfismos causantes de la sobreexpresión del EGFR y en casos especiales se realiza la detección mediante la técnica de Hibridación In-Situ Fluorescencia (FISH) que permite fijar o seleccionar el tratamiento adecuado.

## 1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en carcinoma pulmonar, detectado mediante la técnica de Hibridación fluorescente in situ (FISH), en biopsias bronquiales en pacientes que fueron atendidos en el Servicio de Patología del Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito durante los años 2011 y 2012?

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

La técnica de Hibridación In Situ Fluorescencia (FISH) es una de las técnicas moleculares que en los últimos años ha tenido un gran avance en ayudar a localizar un determinado gen el cual se pone de manifiesto su presencia o ausencia mediante señales fluorescentes en células tanto en interfase como en metafase. (José Javier Gómez, octubre 2011)

La presencia o la ausencia de estas señales han ayudado a observar los diferentes genes los cuales están inmiscuidos en el cáncer como es el caso del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en cáncer pulmonar. (José Javier Gómez, octubre 2011)

Según el Registro Nacional de Tumores SOLCA-Quito (2009), el cáncer de pulmón se encuentra entre los primeros lugares con una incidencia del 2 al 4 %. En el HCAM Quito se reciben entre 70 a 82 muestras bronquiales de estas más del 50% resultan positivas para alguno de los diferentes tipos de cáncer pulmonar siendo uno de los principales el adenocarcinoma pulmonar seguido por el carcinoma escamoso y sus variantes; las edades de este cáncer se encuentran comprendidos entre los 30 a 70 años de edad con una mayor susceptibilidad a sufrirlo los hombres más que las mujeres gracias a los diferentes factores que les afecta tales como el tabaquismo, la presencia de enfermedades crónicas, factores de predisposición genética y factores ambientales. (Patricia Cueva, junio 2009)

La detección de la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) mediante la técnica de FISH ha apoyado en países vecinos tales como Colombia, Perú, Chile, ayudando como factor predictivo de eficacia al tratamiento con inhibidores de quinasa lo cual aporta para la sobreexpresión del gen por lo cual a esta técnica se la ha tomado en otros países como herramienta base para el diagnóstico.

Tomando en consideración que la mayoría de los cánceres de pulmón diagnosticados mediante la biopsia bronquial no tienen una igual sobreexpresión del EGFR, es necesario realizar una comparación por medio de la técnica de FISH para conocer y obtener datos específicos en el Ecuador y así posteriormente proveer un tratamiento adecuado. (Gómez, octubre 2011)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en cáncer de pulmón mediante la técnica de FISH en biopsias bronquiales en pacientes que fueron atendidos en el servicio de patología del HCAM de la ciudad de Quito en los años 2011 al 2012

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Establecer la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en el Adenocarcinoma pulmonar, el Carcinoma Escamoso, el Carcinoma de células Pequeñas, Carcinoma de células grandes en pacientes atendidos en el Servicio de Patología del HCAM de la ciudad de Quito en los años 2011 al 2012.
- Analizar la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en el cáncer pulmonar con los controles positivos y negativos ya conocidos
- Relacionar la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en cáncer de pulmón con la edad y el sexo de pacientes atendidos en el Servicio de Patología del HCAM de la ciudad de Quito en los años 2011 al 2012.
- Examinar la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en cáncer pulmonar con antecedentes familiares y el hábito tabáquico a los que fue anteriormente expuesto en pacientes atendidos en el Servicio de Patología del HCAM de la ciudad de Quito en los años 2010 al 2011

## **3. HIPÓTESIS**

La detección de la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en el cáncer de pulmón mediante la técnica de FISH en biopsias bronquiales tiene una correlación con el tipo de cáncer de pulmón, sexo, edad, hábito tabáquico, y antecedentes familiares a los que ha sido expuesto el paciente.

### **3.1 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

| Variable  | Tipo de variable      | Definición operacional   | Dimensión  | Indicador  | Instrumento                   |
|---|-----------------------|--|--|--|-------------------------------|
| Cáncer de pulmón  | Cualitativa Ordinal   | Patología pulmonar causada por la atipia celular en el tejido determinada por examen histopatológico tomado de la historia clínica | Adenocarcinoma<br>Ca escamoso<br>Ca. De células grandes<br>Ca. De células pequeñas | Frecuencia relativa en porcentaje  | Historia clínica              |
| Sobreexpresión del Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) | Cualitativa Nominal   | Gen de la familia de receptores de quinasas el cual se encuentra sobre expresado en al cáncer de pulmón                            | Positivo<br>Negativo   | Frecuencia relativa en porcentaje  | Diagnostico citogenética FISH |
| Edad  | Cuantitativa discreta | Años presentes en la historia clínica desde los 40 a más de 75   | Presente en la historia clínica  | X, DS, IC  | Historia clínica              |
| Genero  | Cualitativa Nominal   | Característica fisiológica que se encuentra en la historia clínica   | Masculino femenino   | Frecuencia relativa en porcentaje  | Historia clínica              |
| Hábito tabáquico  | Cualitativa Nominal   | Consumo de tabaco del paciente de acuerdo a la historia clínica  | Fumador<br>No fumador  | $\frac{\text{Fumadores}}{\# \text{ total de casos estudiado}}$<br><br>$\frac{\text{No Fumadores}}{\# \text{ total de casos estudiado}}$                        | Historia clínica              |
| Antecedente familiar con carcinoma pulmonar.                            | Cuantitativa Nominal  | Antecedentes del paciente si algún familiar ha sufrido una patología pulmonar de acuerdo a la historia clínica.                    | Presente<br>Ausente  | $\frac{\text{antecedentes familiares}}{\# \text{ total de casos estidiado}}$<br>$\frac{\text{no antecedentes familiare}}{\# \text{ total de casos estidiado}}$ | Historia clínica              |

## **CAPÍTULO II**

### **4. MARCO TEÓRICO**

#### **4.1 EPIDEMIOLOGIA**

El cáncer pulmonar ha manifestado un avance a medida de que las personas han incrementado los hábitos de fumar desde una temprana edad y sin discriminación sexual, ya que en los últimos años las mujeres han aumentado el hábito de fumar. (Cueva, 2009)

La casuística del cáncer pulmonar ha aumentado por el contagio de enfermedades crónicas las cuales al ser prolongadas ayudan a la producción de este cáncer cuyos antecedentes familiares han ayudado al aumento del cáncer de pulmón en el Ecuador “La tasa de incidencia estandarizada en los hombres es de 8.8 y en las mujeres 4.7, que comparada con la de los países desarrollados es bastante baja, en los Estados Unidos y Europa se publican tasas entre 70 y 110 x 100.000 en hombres y entre 30 y 70 en mujeres”. (Cueva 2009)

Las patologías de pulmón con mayor frecuencia de Quito son: el Adenocarcinoma con un 49% seguido del escamoso con el 19.4% y luego con un menor porcentaje los demás tipos de cáncer 1.9 % siendo diagnosticado en mayor porcentaje en los estadios avanzados por lo cual el diagnóstico y el tratamiento son difíciles de poderlos encontrar por lo que llega la mortalidad de este cáncer llega a ser del 70 al 80% de los casos. (Cueva, 2009)

#### **4.2 PULMÓN**

Los pulmones son dos órganos que se encuentran situados en la cavidad torácica y cuya función es el intercambio de gases de CO<sub>2</sub> ha oxígeno. Descansan en el musculo diafragma, se encuentran protegidos por las costillas el esternón y están separados mediante el mediastino, los pulmones se encuentran envueltos mediante membranas serosas denominadas pleuras gracias a su estructura es de gran importancia en la respiración. (Eynard, A. V. 2008).

Los pulmones cuya forma de semicono presenta tres caras y tres bordes, anatómicamente los pulmones se dividen en lóbulos los cuales se encuentran separados

por cisuras. El pulmón derecho dividido en 3 lóbulos y el izquierdo en 2, a la vez los lóbulos se dividen en lobulillos que se encuentran separados por tejido conectivo.

Entre ambos pulmones se encuentra la zona llamada mediastino, donde se aloja el corazón. Éste se encuentra ligeramente desviado hacia la izquierda, lo que explica que el pulmón izquierdo sea menor que el derecho. (Eynard, A. V. 2008).

El hilio es la zona de cada pulmón por donde entran y salen los bronquios y los vasos sanguíneos. Una vez dentro los bronquios se dividen continuamente en bronquios secundarios los cuales penetra en un lóbulo pulmonar por tanto, el pulmón izquierdo tiene dos bronquios secundarios y el derecho tiene tres. Cada lóbulo, a su vez, está dividido en segmentos broncopulmonares, en los que penetra un bronquio terciario que se va ramificando hasta llegar a los alveolos formando los bronquiolos terminales. (Eynard, A. V. 2008).

Histológicamente los bronquios están formados por 5 capas de tejidos las cuales son una mucosa una muscular una submucosa una cartilaginosa y una adventicia las cuales están constituidas de la siguiente manera:

Mucosa. Epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado. La altura de las células va disminuyendo conforme los bronquios son más pequeños.

Muscular. De músculo liso. En los bronquios menores puede aparecer discontinua, ya que es más delgada y menos organizada. Ayuda a mantener el diámetro adecuado de la vía aérea.

Submucosa. De tejido conjuntivo laxo.

Capa cartilaginosa. Placas cartilaginosas discontinuas cada vez más pequeñas.

Adventicia. Tejido conjuntivo de densidad moderada.

La estructura de los bronquios primarios, hasta el momento que penetran en el pulmón tiene la estructura histológica de la tráquea. A partir de este momento los anillos cartilaginosos desaparecen y son sustituidos por placas de cartílago de morfología irregular a lo largo de la circunferencia del bronquio, que se van reduciendo en tamaño. (Eynard, A. V. 2008).

En la mucosa respiratoria que los reviste, el epitelio pseudoestratificado disminuye en el número de capas y en la cantidad de células secretoras, y el tejido conectivo de la lámina propia queda separado de la submucosa por una lámina muscular de la mucosa, más desarrollada cuanto menor es la cantidad de cartílago. En la submucosa pueden presentarse glándulas tubuloacinosas seromucosas.

Los bronquiolos proceden de las últimas ramificaciones de los bronquios y tienen un diámetro menor a 1 mm. A diferencia de los bronquios, su pared carece de cartílago y de glándulas, mientras que el epitelio pseudoestratificado ciliado que reviste su luz carece de células caliciformes y se transforma distalmente en un epitelio simple cilíndrico o cúbico

con células ciliadas y no ciliadas, éstas últimas, que ya estaban presentes aunque en menor número en los bronquios, se denominan células De Clara las cuales tienen un citoplasma claro con una superficie apical que se proyecta hacia la luz sobre la línea del epitelio, por lo que éste presenta un contorno festoneado. Ultra estructuralmente, tienen características de células de secreción serosa (gránulos electro densos) con gran desarrollo de retículo endoplásmico liso. Aunque su función no es del todo conocida se le han atribuido capacidad de producir proteínas con actividad surfactante, antiinflamatoria y hormonal. También se ha podido demostrar su participación en procesos de detoxificación y ser precursoras de células mucosas y ciliadas del aparato respiratorio profundo. (Taus, 2011).

Las ramificaciones distales de los bronquiolos se denominan bronquiolos terminales y su bifurcación da lugar a los bronquiolos respiratorios que ya entran a formar también parte de la porción respiratoria, pues su pared aparece interrumpida por la presencia de alvéolos.

La porción respiratoria está constituida por los alvéolos, cavidades en forma de sacos repletas de aire delimitadas por una pared delgada. Entre las paredes de los alvéolos adyacentes se encuentra una densa red de capilares. Es a través de esta delgada pared por donde tiene lugar el intercambio gaseoso de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a la sangre de los capilares.

Se denomina acino respiratorio al conjunto de alvéolos que se abren a las ramificaciones de un bronquiolo terminal y se identifican de la siguiente forma: bronquiolo terminal-bronquiolos respiratorios-conductos alveolares-sacos alveolares-alvéolos.

Los bronquiolos respiratorios Proceden de la bifurcación de los bronquiolos terminales y constituyen la transición entre las porciones conductora y la respiratoria propiamente dicha, ya que su pared, similar a la de los bronquiolos terminales, está interrumpida por la presencia de alvéolos.

Los conductos alveolares y sacos alveolares: Los bronquiolos respiratorios se bifurcan en conductos alveolares de morfología irregular y sinuosa, formados por alvéolos alineados, entre los que se proyectan una condensación de fibras musculares lisas recubiertas por el epitelio simple cilíndrico o cúbico con predominio de células De Clara y algunas células ciliadas. Los conductos acaban en dilataciones denominadas sacos alveolares, cuyas paredes están constituidas por alvéolos que se abren al centro del saco denominado atrio.

Alvéolos: estructura de la pared alveolar Los alvéolos están tan juntos en el pulmón que cada uno de ellos no tiene una pared independiente, en vez de eso, los alvéolos adyacentes están separados por un tabique o septo interalveolar. Un tabique interalveolar está cubierto por sus dos caras por el epitelio simple que reviste a los alvéolos, entre ambos epitelios el tabique contiene el tejido conectivo.

El epitelio que reviste los alvéolos está formado por dos tipos celulares,

Denominados neumocitos tipo I y II.

- Neumocitos tipo I: también denominados células alveolares planas o epitelio citó respiratorio. Son células planas que revisten la mayor parte de la superficie alveolar, proporcionando una superficie intacta de espesor mínimo, de fácil permeabilidad a los gases. - Neumocitos tipo II: también denominados neumocitos granulares, células alveolares o epitelio citó granular. Se presentan aisladamente o en pequeños grupos entre las células planas, preferentemente en las esquinas o ángulos donde se unen los septos o tabiques alveolares. Son células de morfología redondeada a cúbica que en su superficie libre tienen un pequeño número de micro vellosidades cortas. Se caracterizan por la presencia en su citoplasma de vacuolas que ultra estructuralmente se conocen como cuerpos multilaminares o citosomas, debido a su parecido con figuras de mielina y que contienen una sustancia surfactante que se excreta por exocitosis a la superficie alveolar entremezclándose con moléculas de agua y reduciendo su cohesión, logrando así disminuir la tensión superficial del líquido alveolar, evitando que el alveolo se colapse, lo que hace que la fuerza de inspiración para llenar de aire los alvéolos sea menor. Los neumocitos tipo II son capaces de dividirse y diferenciarse a neumocitos tipo I, por lo que se les considera la principal fuente de renovación celular.

En el intersticio de los tabiques alveolares, constituidos por el almacén de fibras colágenas y elásticas que sostiene la extensa red de capilares anastomosados, aparecen pericitos, fibroblastos, macrófagos y células plasmáticas. En el pulmón aparecen macrófagos en el intersticio, pero además en la luz alveolar (macrófagos alveolares) y en el interior de los capilares (macrófagos intravasculares). Los macrófagos alveolares, procedentes de monocitos que atraviesan el epitelio alveolar, defienden la región respiratoria de la contaminación por microorganismos y partículas inhaladas. Los macrófagos alveolares cargados de partículas del polvo migran de la superficie alveolar hacia los septos o bien son arrastrados con lentitud hacia los bronquiolos, donde son llevados hacia la faringe para ser deglutidos o bien expectorados. Los macrófagos intravasculares se encargan de retirar de la sangre partículas o agentes patógenos de manera similar a como ocurre en los macrófagos esplénicos. (Taus, 2011).

Los poros alveolares (poros de KOHN) perforan la delgada pared alveolar de alvéolos adyacentes y permanecen abiertos en los pulmones expandidos.

Barrera hematoaérea: está constituida por las estructuras a través de las cuales difunden los gases entre el aire alveolar y la sangre, que varían desde las áreas de mayor grosor donde queda representada por: una capa de líquido y surfactante, el delgado epitelio alveolar neumocito tipo I, su lámina basal, el espacio intersticial, la lámina basal del capilar, el endotelio capilar. El menor grosor de esta estructura se sitúa en los sitios donde las asas capilares presionan contra el epitelio, en las cuales el tejido intersticial está excluido o se encuentra en una mínima proporción, estando el epitelio alveolar y el endotelio separado sólo por una membrana basal que resulta de la fusión de la de ambos, facilitándose el intercambio gaseoso. (Bloom, 2001)

Riego sanguíneo: el pulmón tiene un doble riego sanguíneo a través de las arterias pulmonares y bronquiales, correspondientes al aporte funcional y nutricional, respectivamente. Las arterias se ramifican acompañando al árbol bronquial hasta los

bronquiolos respiratorios donde se dividen para formar un abundante plexo capilar. La abundante vascularización con vasos del plexo capilar en los tabiques alveolares permiten reconocer en la ultra estructura que las membranas basales de los vasos sanguíneos se acercan a las membranas basales de los neumocitos tipo I, dejando en medio una mínima fracción de sustancia fundamental amorfa. (Bloom, 2001)

El cambio del O<sub>2</sub> con el CO<sub>2</sub> se realiza gracias a la inspiración y la expiración que se determina por una variación en el volumen de la cavidad torácica debido a los movimientos que efectúan los músculos intercostales y el diafragma para de esta forma poder aumentar y disminuir el volumen de la cavidad torácica las contracciones y relajaciones de estos músculos otorgan como resultado inspiración y la expiración.

El aire a medida va pasando por las vías respiratorias se calienta y se combina con el mismo que se encuentra en ellas y en los pulmones por lo que la composición va cambiando a medida que va llegando a los pulmones. Una vez que el aire arriba a los pulmones el aire inspirado rico en oxígeno que se encuentra en los alveolos pulmonares y el CO<sub>2</sub> que se localiza en la sangre que ha viajado desde el corazón por medio de las arterias pulmonares.

El intercambio que se genera con O<sub>2</sub> encontrado en el espacio alveolar debe intercambiar con el CO<sub>2</sub> que se manifiesta en los capilares sanguíneos tipo fenestrados cuya estructura permite las sustancias de la siguiente manera. El O<sub>2</sub> debe asociarse con la hemoglobina de los eritrocitos (oxihemoglobina), y el CO<sub>2</sub> de igual forma asociado con la hemoglobina de los eritrocitos (carboxihemoglobina) debe alcanzar el espacio alveolar, dichos gases deben difundirse entre una barrera hematoaérea descrita anteriormente, debido a la disposición de los tejidos que son de consistencia muy delgada se elabora el cambio de la oxihemoglobina que se presenta en los alveolos a carboxihemoglobina que se encuentra en los capilares sanguíneos, el CO<sub>2</sub> se libera de la hemoglobina cuando se halla en los pulmones se desarrolla la expiración por medio de las contracciones musculares de los músculos intercostales y el diafragma. (Paulina, 2007 )

El oxígeno unido a la hemoglobina que está en los capilares sanguíneos viaja al corazón a través de las venas pulmonares para posteriormente ser transportado hacia todo el cuerpo.

Cuando existe alguna injuria a los epitelios causada por alguna bacteria, virus, hábito tabáquico y factores externos el intercambio de oxígeno será menor a lo necesario para el cuerpo y de esta manera las células tendrán que ejecutar adaptaciones al medio las cuales pueden ser irreversibles y conllevar a neoplasias malignas como el cáncer en los pulmones. (Paulina, 2007 )

### 4.3 PATOLOGÍAS

El cáncer pulmonar es una de las neoplasias más frecuentes encontradas en hombres como en mujeres ya que el hábito de fumar ha aumentado en los últimos años. Siendo esta una de las mayores causas de muerte que existe en el mundo como en el Ecuador, desafortunadamente estas neoplasias pulmonares son diagnosticadas en un estadio tardío por lo cual la supervivencia del paciente que la sufre tiene una mayor probabilidad de morir a causa de esta neoplasia. (Robbins, 2008)

La alta prevalencia que se halla en las neoplasias pulmonares se encuentra en mayor cantidad en los adultos entre una edad promedio desde los 40 a los 70 años por medio de los diagnósticos evaluados se les puede facilitar diferentes tipos de tratamiento llegando a tener una mejor condición de vida para el paciente, de tal forma es de gran importancia generar los exámenes adecuados para determinar la posibilidad de asignar un diagnóstico molecular acertado para los métodos personalizados como el tratamiento contra el EGFR en carcinomas primarios de pulmón. (Emanuel Rubín, 2012)

El 80% de las personas que sufren esta neoplasia tiene un tiempo de vida de 3 a 5 años luego de ser diagnosticada la enfermedad, la mayoría de estos pacientes no pueden ser operados, lo que conlleva a que la supervivencia de los mismos sea menor al promedio. (Emanuel Rubín, 2012)

Las causas para la formación de las neoplasias del pulmón es el consumo de tabaco, el consumo del tabaco está ligado a un 90% de cánceres de pulmón, siendo el principal factor para que sea el cáncer con más incidencia en el hombre, el cual produce cambios atípicos en las células de los epitelios del pulmón gracias a los compuestos que el tabaco contiene como nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, estos compuestos son llevados al pulmón activando enzimas las cuales producen alteraciones en el material genético este conlleva a la generación de células neoplásicas causantes de la producción del cáncer pulmonar (Robbins, 2008)

El cáncer de pulmón gracias a estudios que se han realizado el riesgo está relacionado con la exposición total al tabaco, entendida como el número diario de cigarrillos fumados, la edad a la que se comienza a fumar y el número de años durante los que una persona ha fumado. Además, como es sabido, el riesgo de cáncer de pulmón se extiende a los fumadores pasivos, habiéndose calculado que la mitad de todos los cánceres de pulmón entre los no fumadores se deben al consumo pasivo. El consumo de cigarrillo se ha encontrado en la mayoría de pacientes con neoplasia pulmonares en los cuales se ha demostrado mayor afectación en las células pulmonares. (Rodríguez Costa, 2005)

La reducción en la esperanza de vida por el cáncer de pulmón en los fumadores es proporcional al número de cigarrillos fumados habitualmente durante un período regular de 30-40 años; así, fumando 10 cigarrillos al día se reduce la esperanza de vida en unos 2-3 años, mientras que fumando 40 cigarrillos al día se reduce, por término medio unos 8-

10 años. A la inversa, tras 10 años sin fumar, la esperanza de vida por este concepto, casi se iguala a la de un no fumador, salvo que ya tenga un cáncer de pulmón incipiente. (DeMay, 2012)

El consumo de cigarrillo aumenta el riesgo a sufrir los cuatro tipos de cáncer de pulmón es el carcinoma escamoso pulmonar, el adenocarcinoma, carcinomas de células pequeñas y el carcinoma de células grandes, aunque es mayor en los dos primeros, esto sucede de modo más pronunciado cuanto más joven es el sujeto que inicia el tabaquismo ya que por la exposición de los agentes carcinógenos que contiene el cigarrillo causan las alteraciones genéticas y desciende a medida que pasa el tiempo desde su abandono. (Emanuel Rubín, 2012)

Diversos estudios han demostrado también el aumento de riesgo de cáncer pulmonar que acompaña tanto a las parejas de fumadores como a los jóvenes adolescentes que han convivido con fumadores. El riesgo de los fumadores pasivos es también superior al de los no expuestos al humo ambiental del tabaco; ello es debido a la mayor concentración de nicotina, alquitrán y monóxido de carbono en la corriente secundaria, que procede del cigarrillo, que en la principal, exhalada por el fumador. (Bartechi et al., 1994).

Los otros factores que se encuentran inmiscuidos en las neoplasias son la edad el sexo y los antecedentes familiares cuya tasa de incidencia se encuentra en mayor cantidad en hombres que en mujeres que pasan de los 40 años de edad, en cuanto los antecedentes familiares en estudios que se han realizado nos indican que las personas que se tienen familiares tales como hijos, padres y hermanos que han sufrido cáncer de pulmón ellos tiene un riesgo mayor a contraer la enfermedad. (Robbins, 2008)

Las Neoplasias pulmonares malignas primarias más comunes en el Ecuador como en el mundo son el Adenocarcinoma pulmonar, el Carcinoma Escamoso, el Carcinoma de células Pequeñas, Carcinoma de células grandes cuyas características diferentes ayudan al diagnóstico diferencial entre estas neoplasias. (Emanuel Rubín, 2012)

El diagnóstico del tipo de neoplasia pulmonar es muy importante ya que con cada tipo de cáncer se comporta de diferente manera por esta razón los médicos oncólogos dan el tratamiento al paciente diagnosticado con alguna de las patologías dichas anteriormente. (Robbins, 2008)

#### **4.3.1 ADENOCARCINOMA DE PULMÓN**

El Adenocarcinoma pulmonar es una de las neoplasias pulmonares más comunes en las patologías del pulmón el cual se encuentra en mayor cantidad de mujeres mayores de 40 años y en personas que el consumo de tabaco es menor que al carcinoma escamoso. (Emanuel Rubín, 2012)

Este se origina en los epitelios alveolares y en las glándulas mucosas por lo que tiene a formarse en las células broncas alveolares, y en células productoras de mucina gracias a esto se localiza cercanos a los tabiques alveolares y cerca de los bronquiolos terminales. (Rodríguez Costa, 2005)

Histológicamente el Adenocarcinoma de pulmón se lo puede encontrar con diferentes patrones histológicos tanto el acinar como el papilar o ambos con sus características histológicas y citológicas que los diferencian. (DeMay, 2012)

Al Adenocarcinoma acinar es una de los Adenocarcinoma más comunes en el pulmón cuya característica principal es la formación de grupos glandulares de forma de acinos de diferente tamaño revestida de células neoplásicas cubicas en cuyo lumen se puede observar mucina. (Emanuel Rubín, 2012)

El Adenocarcinoma papilar es una neoplasia pulmonar cuya estructura histológica se observa la formación de papilas en las cuales se pueden ver micro calcificaciones y formación de cuerpos de psammoma el cual se debe realizar el diagnostico diferenciar con tumores metastasicos gracias a estas características histológicas. (Emanuel Rubín, 2012)

Las características histológicas y citológicas del Adenocarcinoma son las siguientes: células de Adenocarcinoma pueden manifestarse individualmente y en grupos característicos, incluyendo acinos, túbulos, las bolas de células, y papilas, dependiendo del grado de diferenciación. Hojas de dispuestas irregularmente, celdas superpobladas, desordenados, con bordes mal definidos de células. (DeMay, 2012)

Adenocarcinoma escasamente diferenciado crece en los agregados sincicial que pueden mostrar poca evidencia de diferenciación glandular.

Las células de Adenocarcinoma son relativamente grandes y varían de cuboidal a columnar. Un rasgo característico del Adenocarcinoma, incluso cuando escasamente diferenciado, es la presencia de polaridad núcleo citoplasma. El citoplasma varía de homogénea finamente vacuolado. Sin embargo, las grandes vacuolas sugieren metástasis o reactivos condiciones. El citoplasma se pigmenta débilmente basófilo, pero el color no es específico. Las células degeneradas pueden manchar eosinofílica donde los bordes de las celdas son indistintos y mal definido en comparación con aquellos en el carcinoma de células escamosas. Los tumores mejor diferenciados pueden contener vacuolas secretoras de mucina positiva. (DeMay, 2012)

Las células se han ampliado en los núcleos con altas relaciones en el Núcleo citoplasma. La cromatina es típicamente más finamente granular y los nucléolos más prominente en el Adenocarcinoma que en el carcinoma de células escamosas. Clásicamente, un solo macro nucléolo rojo cereza se ve en el centro de un núcleo relativamente pálido. Sin embargo, la calidad de la cromatina y el tamaño y número de nucléolos son variables. La membrana nuclear es a menudo irregular o lobulada. La Multinucleación es relativamente común. (DeMay, 2012)

Un tipo muy común en los Adenocarcinoma es el Adenocarcinoma bronquio alveolar cuyo crecimiento se encuentra a partir de los alveolos pulmonares el cual histológicamente se los diferencia por la formación de cadenas de células neoplásicas atípicas con una importante producción de mucina. (Robbins, 2008)

El Adenocarcinoma pulmonar tiene una mayor capacidad de metastatizar sin importar el tamaño del tumor, los adenocarcinomas pulmonares no obstruyen ni afectan vías aéreas ya que por lo general afectan a zonas periféricas del pulmón. Si el adenocarcinoma es detectado a tiempo el pronóstico del paciente gracias al tratamiento es mejor que al de las otras neoplasias malignas. (Emanuel Rubín, 2012)

#### **4.3.2 CARCINOMA ESCAMOSO**

Antes de presentarse esta neoplasia pulmonar maligna se encuentran lesiones anteriores durante años como son la metaplasia escamosa en el epitelio bronquial hasta llegar a un carcinoma in-situ para así evolucionar en un carcinoma invasor escamoso. (Rodríguez Costa, 2005)

El carcinoma escamoso pulmonar más frecuente encontrarlo en hombres que mujeres. Esta altamente relacionado con el consumo de tabaco con gran predisposición a presentarse en regiones centrales de bronquios de gran tamaño. (Emanuel Rubín, 2012)

En el estudio histológico de esta lesión va desde una buena diferenciación que presenta células atípicas con características escamosas, con células pleomorfas grandes con abundante citoplasma y nucléolo prominente con perlas de queratina y puentes intracelulares hasta llegar a perder toda su diferenciación las cuales tienen características escamosas mínimas. (Emanuel Rubín, 2012)

El tumor está compuesto de células escamosas anormales con marcado pleomorfismos, incluyendo formas extrañas celulares (serpientes, renacuajos, etc.) y células de calabaza (células grandes, redondos, de color naranja condensado, a menudo núcleos anormales de puntos de tinta oscura). Encontrar células muy pequeñas con altas relaciones Núcleo Citoplasma, grandes células con bajas relaciones Núcleo Citoplasma es característico de queratinizante de carcinoma de células escamosas. (DeMay, 2012)

El citoplasma es denso, ceroso, o difícilmente de escaso a abundante. Realizando una citología las Células tumorales basofílicas menudo predominan en cepillado bronquial, y eosinofílica o células orangeofílicas predominan en el esputo.

Se puede observar anillos concéntricos alrededor del núcleo puede ser contemplado debido a la queratinización. Con frecuencia hay una demarcación clara entre el ectoplasma y endoplasma, y los bordes de las celdas están claramente definida se puede encontrar los espirales de Herxheimer (retorcidos, agregados viscosas de filamentos) son otra característica de la queratinización. Puentes intercelulares bien definidos son de

utilidad diagnóstica. Sin embargo, pueden ser difíciles de apreciar en las muestras citológicas de rutina, pero puede ser visto más fácilmente en los cortes histológicos. (Erozan YS, 2007)

Los núcleos también son pleomórficos, con la cromatina varía de irregular, grueso, e hipercromáticos con la compensación y la formación de grumos. Además la degeneración nuclear (cariorrhexis) es común en el carcinoma de células escamosas, y algunas células pueden perder sus núcleos en total (cariolisis), dando como resultado, escamas a nucleadas pleomórficas, o "fantasmas". Multinucleación se produce y los múltiples núcleos a menudo moldear el uno al otro. Aunque nucléolos visibles se pueden ver en el carcinoma de células escamosas, que son más a menudo poco visibles a invisible, están ocultos por la cromatina degenerada. Las figuras mitóticas, incluyendo las formas anormales, ocasionalmente pueden ser vistas, pero son raras. (Erozan YS, 2007)

Se localiza en regiones cercanas al hilio por lo cual el tumor puede taponar vías respiratorias y el paciente puede morir por asfixia. (Robbins, 2008)

La metástasis del carcinoma escamosos de pulmón son más tardías que los otros tipos de neoplasias malignas estos pueden producir una necrosis central y cavitaciones en el pulmón ya que estos suelen alcanzar grandes tamaños antes de metastatizar, el tratamiento diagnosticado a tiempo ayuda impedir un crecimiento de la masa tumoral. (Emanuel Rubín, 2012)

#### **4.3.3 CARCINOMA DE CÉLULAS GIGANTES**

Es una neoplasia pulmonar indiferenciada muy agresiva el cual por la atipia celular se lo puede llegar a confundir con un adenoescamoso pobremente indiferenciado mediante la microscopia óptica. (Emanuel Rubín, 2012)

El diagnóstico de los cortes histológicos de este tipo de neoplasia maligna se la puede diagnosticar gracias a sus núcleos grandes, con nucléolos prominentes y una cantidad moderada de citoplasma y no presenta ninguna estructura anteriormente mencionada. (Rodríguez Costa, 2005)

La localización de estos tipos de carcinomas al igual que los adenocarcinomas se localiza en la parte periféricas y muestran una gran invasión a los vasos sanguíneos y vasos linfáticos por lo cual la metástasis de este tipo de neoplasia es muy común y en un tiempo muy corto. (Robbins, 2008)

#### 4.3.4 CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS

Los carcinomas de células pequeñas es otra neoplasia maligna pulmonar poco diferenciada el cual afecta en su mayor porcentaje a los hombres que a las mujeres está muy relacionado con el consumo de cigarrillo. (Rodríguez Costa, 2005)

La localización de esta neoplasia es central de un color grisáceo y con las extensiones al parénquima pulmonar, son de un gran poder invasivo por la vía hematógica y linfática. (Emanuel Rubín, 2012)

Las características histológicas de este tipo de neoplasia es la atipia celular con las siguientes características la presencia de células de pequeño tamaño de forma redonda o fusiforme con citoplasma escaso, núcleos hipercromáticos, con una gran presencia de figuras mitóticas atípicas, no encuentran ninguna formación granular ni escamosa es muy similar a los linfocitos. (Robbins, 2008)

Las células están dispuestas en racimos sueltos que se parecen al carcinoma de cuello uterino in situ, o como células individuales en proporciones variables. Son células pequeñas se encuentran a menudo en conjuntos lineales ("cadenas"). El tamaño de la celda varía de aproximadamente una a dos veces el tamaño de un linfocito. (DeMay, 2012)

Las células a menudo presentan moldeamiento nuclear prominente. Los núcleos son pleomórficos dentro de su rango de tamaño pequeño, que varía de redonda a muy angular. La membrana nuclear es irregular. La cromatina es hipercromática, y varía de finamente granular en células bien conservadas a núcleos picnóticos. (DeMay, 2012)

En el carcinoma de células "de avena" clásico, los nucléolos son siempre invisibles o poco visibles. Los nucléolos prominentes son pobremente diferenciados en el carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma. (DeMay, 2012)

El citoplasma es muy escaso y delicado, que consiste en una brizna basófilo delgada. La diátesis tumoral es característicamente presente alrededor de las células tumorales. Debido a que las células tumorales son muy frágiles, el aplastamiento a menudo está presente. (DeMay, 2012)

Los carcinomas de células pequeñas o de células en avena son neoplasias con los peores pronósticos hacia el paciente gracias a su gran capacidad de invadir y metastatizar. (Emanuel Rubín, 2012)

#### 4.3.5 MECANISMO MOLECULAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Una neoplasia es una masa anormal de tejido de crecimiento prácticamente autónomo que supera el de los tejidos normales. Lo podemos diferenciar de las proliferaciones neoplásicas porque el crecimiento de los tumores persiste cuando cesan los estímulos que dieron lugar al cambio, sin embargo, en las proliferaciones no neoplásicas al cesar los estímulos cesa el crecimiento.

Las neoplasias malignas son una enfermedad genética. En la mayor parte de los casos, los agentes ambientales externos provocan lesiones genéticas en las células somáticas que dan lugar a la aparición del cáncer. Pero en otras ocasiones las alteraciones genéticas son hereditarias. Se las puede definir como un trastorno celular que se caracteriza por un acúmulo progresivo de células como consecuencia de una proliferación celular. (Eynard, 2008)

Las lesiones genéticas pueden afectar a cuatro tipos de genes: protooncogenes promotores del crecimiento, genes supresores del tumor que inhiben su crecimiento, genes que regulan la apoptosis y genes que regulan la reparación del DNA, dando a las células neoplásicas las siguientes características específicas: inmortalidad, inestabilidad genética proliferación progresiva, invasión y metástasis.

La génesis y el desarrollo tumoral, son el resultado de numerosas alteraciones moleculares que se producen en el ADN y donde están implicados los oncogenes y los genes supresores tumorales.

Los oncogenes son genes “dominantes” que codifican proteínas (oncoproteínas) que regulan el crecimiento y la diferenciación celular pero que a través de variaciones en su secuencia de nucleótidos por mutación, amplificación o reordenamiento cromosómico adquieren capacidades tumorigénicas. (Eynard, 2008)

Los genes supresores tumorales (antioncogenes) son genes “recesivos” que sirven para regular la proliferación celular.

Los oncogenes se dividen en grupos en función de las propiedades bioquímicas que presentan sus productos proteicos:

**Factores de crecimiento:** Los factores de crecimiento son polipéptidos secretados por las células, cuya función es unirse a un receptor específico y estimular el crecimiento celular.

La activación de los protooncogenes supone una estimulación autocrina (sobre la propia célula) o paracrina (sobre células vecinas) de la producción de factores de crecimiento. Por ejemplo el oncogén *sis* codifica para la cadena beta del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) liberado por las plaquetas durante la coagulación.

Receptores de los factores de crecimiento: Son proteínas de la membrana citoplasmática que presentan tres áreas o dominios: Dominio extracelular, Dominio transmembrana, Dominio intracelular, también conocida como zona tirosina Quinasa.

Transmiten información unidireccional desde la superficie de la célula, mediante la unión de un factor de crecimiento específico, hasta la zona citoplasmática, donde la cascada de reacciones bioquímicas iniciada en la zona tirosina quinasa, termina en el núcleo celular estimulando la síntesis de material genético. Las alteraciones en estos receptores inducen a un crecimiento anormal. (Eynard, 2008)

Transductores de señales: La transducción de señales consiste en una cascada bioquímica que se inicia en el interior de la membrana citoplasmática y termina en el núcleo de la célula, estimulando la síntesis de ADN.

Destaca los oncogenes de la familia ras (H-ras, K-ras, N-ras) que codifican proteínas relacionadas con el ATP.

La unión de ras-ATP es la forma activa de la proteína, mientras que la unión ras-ADP, es la forma inactiva. Un estímulo externo es capaz de activar la fosforilación de ras-ADP a ras-ATP, que actúa activando una cascada bioquímica intracelular en la que están implicados numerosos protooncogenes, incrementando la síntesis de ADN. Ras mutado (oncogénico) no reconoce la proteína responsable de la inactivación de ras, por lo que se produce un estímulo continuo de ras.

Activadores de la transcripción: También denominados oncogenes nucleares. Se caracterizan por codificar proteínas que se unen al ADN activando la transcripción de otros genes, que estimularán la replicación del ADN de forma directa o indirecta.

Dentro de este grupo de genes se incluyen los genes supresores de tumores, la familia de genes myc.

Relacionados con la regulación del ciclo celular: La proliferación celular es un proceso regulado por una enzimas denominadas quinasas dependientes de ciclinas (cyclin-dependent kinase o CDK) capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfatos a aminoácidos específicos.

La actividad de las CDK depende de la formación de complejos con otras proteínas específicas del ciclo, como las ciclinas. La activación de las CDK por su unión a las ciclinas genera una cascada de señales por fosforilación/ desfosforilación que permite la transcripción y traducción de aquellos genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Cualquier cambio en estas enzimas estimula la proliferación celular desordenada.

En este proceso también intervienen genes supresores tumorales (p16) que inhibe la actividad de las quinasas.

Reguladores de la apoptosis: La ejecución de una muerte programada está asociada a una serie de características morfológicas y cambios bioquímicos.

El proceso de apoptosis es de central importancia para el desarrollo y mantenimiento de la vida.

La apoptosis utiliza mensajeros primarios o factores como el ligando reconocidos por receptores específicos de membrana. Una vez activados, los receptores transfieren la información al interior celular mediante un complejo sistema de interacciones proteína-proteína, que termina en la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas provocando la desconexión de los sistemas de reparación del ADN y la activación de la nucleasa encargada de la degradación del ADN. Este proceso depende de la presencia de los denominados "death domain" (DD). (Eynard, 2008)

Mecanismos de activación de los protooncogenes : Se trata de la transformación de una célula benigna, los proto-oncogenes, en células neoplásicas, los oncogenes, por cambios genéticos en la secuencia de nucleótidos de los genes que regulan el crecimiento y la diferenciación.

Mutaciones: La mutación supone un cambio hereditario en la secuencia de nucleótidos de un organismo y puede o no tener consecuencias en el fenotipo (manifestación externa y visual de las características de un organismo).

El proceso por el cual se adquiere una mutación se conoce como mutagénesis.

Mutaciones puntuales: Es el tipo de mutación más frecuente. Supone el cambio de una base nitrogenada por otra, o bien la inserción o la delección de una base nitrogenada. Puede ser:

Transiciones: cuando hay un cambio de una base púrica por otra púrica, o pirimidínica por otra pirimidínica.

Transversiones: cambio de una base púrica por una pirimidínica o viceversa.

Los efectos de una mutación puntual sobre el fenotipo celular pueden ser muy diversas. La más conocida es la de la familia ras observada en numerosos tipos tumorales.

Inserciones o Delecciones: inclusión o pérdida de una base, con la consecuencia de pérdida de lectura del código genético.

Amplificación génica: incremento en el número de copias de un gen dentro del genoma. Implica alteraciones cromosómicas denominadas double-minute-chromosome (Dms), que son estructuras microcromosómicas sin centrómeros que representan amplias regiones del ADN genómico que contienen cientos de copias de un gen determinado. La amplificación conduce a un incremento en la expresión del gen y generalmente se relaciona con un incremento de la proliferación celular.

Translocaciones: implica roturas cromosómicas y su posterior unión en cromosomas distintos. Este mecanismo produce proteínas quiméricas que pueden activar la síntesis de productos anormales, como ocurre en la leucemias mieloides crónicas

donde existe una fusión entre los cromosomas 9-22 resultado de la unión de los genes c-abl (Cromosoma Philadelphia). Otro ejemplo característico de la activación transcripcional es el que se produce en el Linfoma de Burkitt con el gen c-myc.

Sobreexpresión: existe un aumento de la transcripción de un gen y de producción de proteínas. (Eynard, 2008)

## **4.4 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR)**

### **4.4.1 GENERALIDADES**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR es una glicoproteína ubicada en la membrana plasmática que se encuentran en las células epiteliales normales. Esta glicoproteína es parte de la familia de receptores de tirosina quinasa que se encuentran en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligando específicos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), las cuales son encargadas además de la proliferación celular, estas proteínas conocidas como ErbB o HER han sido blancos para tratamientos oncológicos gracias a su función de proliferadores celulares ya que su sobreexpresión ayuda a los mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral.(D. Isla, 2011)

El gen que codifica el EGFR es uno de los genes que ha tenido un mayor estudio por su actividad de proto-oncogen el cual gracias a su mutación en las células neoplásicas se convierte en oncogén, los cuales se encuentran en las fases del ciclo celular. (D. Isla, 2011)

Las funciones principales del EGFR es la maduración de órganos en los tejidos embrionarios, mientras en el adulto ayuda en la reparación de órganos y la cicatrización de heridas. Este gen tiene un gran valor en la proliferación celular y juega papeles importantes en tejidos los cuales se encuentran en una constante reparación, gracias a estas funciones el EGFR mutado ayuda a la proliferación de las células neoplásicas. (Makoto Maemondo, 2010)

### **4.4.2 ESTRUCTURA DEL EGFR**

El EGFR se encuentra ubicado en el brazo corto región p12-p13 del cromosoma 7, es una glicoproteína que se encuentra en la membrana celular la cual está constituida por tres dominios un extracelular compuesto por aminoácidos el cual se une al ligando para ser activado, un dominio transmembrana constituido por fosfolípidos y un dominio citoplasmáticos carboxilo terminal el cual es el responsable de la actividad tirosina

quinasa. La mayor parte de la estructura está compuesta por cadenas glicosiladas las cuales ayudan a su plegamiento en la membrana celular las cuales ayudan a su funcionamiento. (Makoto Maemondo, 2010)

Existe una serie de ligando los cuales interactúan con el dominio extracelular los cuales ayudan a los procesos en los que se encuentra reaccionado el EGFR.

Cuando existe una ausencia de los ligandos del EGFR se mantiene inactivo, una vez que el ligando se encuentra con el dominio extracelular del gen este se dimeriza el cual inicia una cascada de eventos celulares con la activación del ciclo celular, cuando existe una sobreexpresión del EGFR llevan una activación de señales las cuales pueden producir la proliferación celular descontrolada, la migración de las células neoplásicas, la evasión de la apoptosis la invasión y la metástasis procesos muy importantes en la carcinogénesis. (D. Isla, 2011)

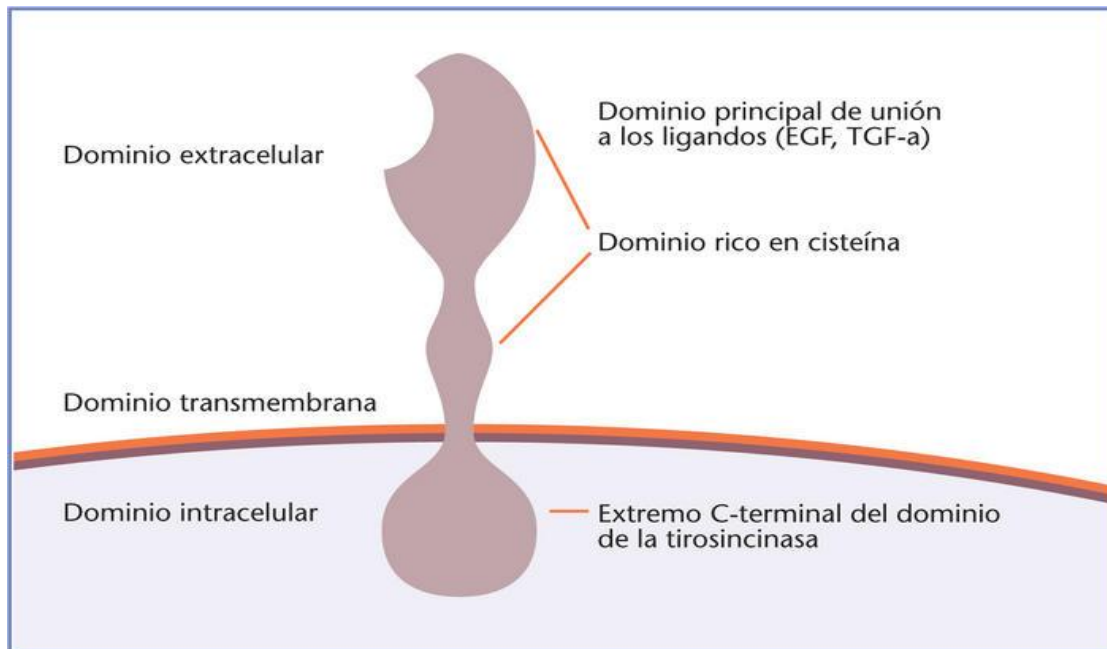


IMAGEN 1 (Marian Carretero, dfarmacía.com, 2014) estructura del EGFR.

#### 4.4.3 ACTIVACION DEL EGFR

El EGFR receptor que se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligando específicos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ). (J. P. RODRIGO TAPIA1, 2011)

La traducción de las señales del EGFR ocurre con un proceso secuencial y de múltiples pasos iniciando con la activación del EGFR con la interacción del receptor con su ligando el cual lleva la dimerización las cuales puede ocurrir entre dos moléculas del

mismo receptor (homodimerización) o entre otros miembros de la familia de las tirosina quinasas (heterodimerización) el cual activa el dominio de proteína quinasas intracelular de cada receptor para los residuos de tirosina quinasas de otra molécula de EGFR, estos residuos actúan como sitios de unión para proteínas adaptadoras y sustratos adicionales esto ocurre en el citoplasma de la célula. (D. Isla, 2011)

Además de la formación de homodímeros después de la unión del ligando, el EGFR puede unirse a otro miembro de la familia de receptores ErbB, como el ErbB2/Her2/neu, para crear un heterómero activado. (J. P. RODRIGO TAPIA1, 2011)

La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa. Como resultado, en el dominio C-terminal del EGFR se produce la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina. Esta auto-fosforilación provoca la activación en cascada y la señalización por varias otras proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas mediante la unión en los dominios SH2 de la fosfotirosina. Estas proteínas de señalización inician cascadas de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Estas proteínas modulan fenotipos tales como la migración celular, la adhesión y proliferación. (Makoto Maemondo, 2010)

El principal mecanismo para la activación del EGFR es por la unión del ligando existen otras opciones las cuales pueden activar el EGFR las cuales son las siguientes:

- El incremento de la expresión del receptor debido a las alteraciones del gen el cual aumenta el receptor en la superficie celular el cual favorece la unión entre moléculas del EGFR gracias a esto favorece la activación del gen en mayor cantidad gracias a los niveles de fosforilación altos que favorece la actividad de la fosfatasa en la célula. (D. Isla, 2011)
- La activación de las tirosina quinasas por las alteraciones moleculares ya sean estas puntuales o por translocaciones de otros genes que están inmersos en la actividad de tirosina quinasas. (D. Isla, 2011)

Cualquiera que sea la ruta de activación del EGFR cuando es en condiciones patológicas existe una sobreexpresión del gen el cual ayuda al proceso de la carcinogénesis. (D. Isla, 2011)

#### **4.4.4 EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN**

En los estudios que se han realizado sobre la sobreexpresión del EGFR en cáncer de pulmón han encontrado en su mayoría una gran anomalías en su estructura tanto en el EGFR como en el Ligando el cual ayuda para su activación. (Gorlova OY, 2013)

El EGFR se expresa en células normales en niveles bajos por célula. Sin embargo, en células de tumores de origen epitelial como el de pulmón el EGFR está sobre expresado y puede llegar a niveles 20 veces mayores que lo normal. (López-Ríos, 2010)

También se ha demostrado que la sobreexpresión de EGFR se correlaciona con un peor pronóstico, mayor índice de proliferación celular, a la angiogénesis, mayor capacidad invasiva y de metástasis. (Makoto Maemondo, 2010)

Gracias a la presencia de una gran cantidad de copias de EGFR en la célula esta provoca que exista un aumento de la sensibilidad para la unión con los ligando los cuales son capaces de estimular a la célula que se prolifere en gran cantidad y de una forma continua. (Gorlova OY, 2013)

También es frecuente en una gran variedad de tumores la sobreexpresión de los genes con capacidad de tirosina quinasas tales como HER2 y HER3. Aunque HER2 no tiene un ligando natural conocido, la heterodimerización con EGFR reduce la tasa de endocitosis y degradación, y promueven su reciclaje hacia la superficie celular. (Makoto Maemondo, 2010)

La expresión incrementada de HER2 conlleva un incremento de la actividad de la MAPK dependiente de EGFR activado por ligando, y aumenta la capacidad de transformación y el crecimiento de las neoplasias. (López-Ríos, 2010)

Estudios han encontrado mutaciones en el EGFR el cual han identificado un gran número de deleciones en los dominios extracelulares y en menor medida en los dominios intracelulares, se han encontrado tres deleciones del gen del EGFR de gran importancia en el dominio extracelular gracias a esto el EGFR se lo divide en tres tipos el EGFRvI el cual está continuamente activo y sin regulación de su ligando; EGFRvII este tipo mantiene la capacidad de unir el ligando con aumento de su capacidad de tirosina quinasa y el EGFRvIII es el tipo más común el cual mantiene el receptor de los ligandos constitutivamente activo sin que exista una regulación por endocitosis, este tipo de EGFR aumenta la capacidad de la carcinogénesis en las células atípicas que lo sobre expresan. (Makoto Maemondo, 2010)

La actividad incontrolada EGFR se ha implicado en muchos factores del crecimiento tumoral, incluyendo la promoción de proliferación celular, la angiogénesis, la evasión de la apoptosis, la invasión, la metástasis. (Mitsudomi T)

- Proliferación celular: La activación del EGFR induce la expresión de ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S, y favorece una rápida y descontrolada proliferación celular. (Mitsudomi T)

- Angiogénesis: La señalización a través del EGFR incrementa la producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleucina 8 y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), y favorece el proceso de angiogénesis que resulta vital para el crecimiento tumoral). (Mitsudomi T)

- Invasión celular y metástasis: Se ha demostrado que la activación del EGFR induce el desprendimiento de las células de la matriz extracelular e induce la síntesis de matriz-metaloproteasas (MMP) en especial MMP9, favoreciendo la degradación de la membrana basal, la invasión celular y el proceso de metastización. (Mitsudomi T)

- Apoptosis: Se ha propuesto que la activación del receptor induce la expresión de Bcl2, una proteína anti-apoptótica, favoreciendo la sobrevivencia de las células tumorales. (Mitsudomi T)

Cuando estas mutaciones EGFR están presentes, el comportamiento clínico del tumor y, sobre todo, la respuesta terapéutica a los inhibidores tirosincinasa de EGFR, dan lugar a una supervivencia que sobrepasa los dos años de mediana frente a menos de doce meses del cáncer de pulmón convencional. (Mitsudomi T).

Cuando estas mutaciones EGFR están presentes, el comportamiento clínico del tumor y, sobre todo, la respuesta terapéutica a los inhibidores tirosina quinasa de EGFR, dan lugar a una supervivencia que sobrepasa los dos años de mediana frente a menos de doce meses del cáncer de pulmón convencional. (Mitsudomi T)

#### **4.4.5 DETECCIÓN DEL GEN DEL EGFR**

La detección del gen EGFR mediante técnicas como PCR y FISH en los últimos años han avanzado con rapidez y esto ha ayudado a que los diagnóstico de este gen. (Molina-Vila MA, 2008)

La detección del EGFR por medio de estas técnicas se ha estudiado en gran cantidad ya que el hallazgo de la sobreexpresión de este gen ayuda al tratamiento para los pacientes que sufren cáncer de pulmón. La técnica de FISH una de las más usadas ya que su sencillez y reproducibilidad permite identificar al EGFR de forma simple ya que permite identificar el aumento de las copias de este gen mediante el conteo celular en las células neoplásicas. El estudio de esta técnica se lo ha podido realizar In-vivo mediante técnicas enzimáticas y ha servido para ver el incremento del EGFR en las células neoplásicas. (López-Ríos, 2010)

Otra técnica muy utilizada es la PCR mediante la secuenciación del ADN esta técnica a ayudado para observar las secuencias predictoras para los tratamientos con fármacos,

gracias a esta técnica de mayor sofisticación ha ayudado a los pacientes a que reciban un mejor tratamiento hacia las neoplasias en la que se encuentren el EGFR, la PCR más utilizada para realizar estudios posteriores con los pacientes que han recibido algún fármaco inhibidor del EGFR para poder observar la respuesta que ha tenido el paciente hacia estos tratamientos los cuales han dado un resultado mayor al 70% en los estudios que se han realizado. (Mitsudomi T).

Estas técnicas de biología molecular y citogenética han ayudado a observar las mutaciones en el cromosoma 7 las cuales muestran la sensibilidad de la técnica hacia la detección de los inhibidores de tirosina quinasa, gracias a estas técnicas han ayudado a los laboratorios de anatomopatología la detección de la sobreexpresión y la diversidad genética en los diferentes tipos de cáncer de pulmón. (Zudaire, 2008)

## CAPÍTULO III

### 5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

#### 5.1 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

La citogenética ha tenido un gran desarrollo en los últimos años para el diagnóstico de enfermedades con trastornos genéticos y moleculares. La técnica de hibridación in situ permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cortes tisulares, células o cromosomas morfológicamente preservados en este caso la utilización de esta técnica se la elaboro para la detección del EGFR en cortes tisulares.

La hibridación in situ fluorescente (FISH) es una técnica empleada para la detección del gen EGFR gracias a que utiliza sondas marcadas con fluorocromos las cuales van dirigidas hacia el gen del EGFR en las células tumorales lo que permite la identificación rápida y específica de estas células. (Molina-Vila MA, 2008)

El FISH permite identificar, de forma simple y reproducible, el número de copias del gen. Así, se ha encontrado una posible correlación entre el aumento del número de copias del gen EGFR contabilizadas por FISH y la eficacia de los inhibidores de la tirosina quinasa a pesar de que está pendiente de demostrar in vivo que el aumento en el número de copias de EGFR implica un incremento en la señalización independiente de ligando, sobre todo con métodos enzimáticos. (Molina-Vila MA, 2008)

El apareamiento de la sobreexpresión del gen mediante la técnica de FISH se da gracias a la observación de más de dos señales en las células neoplásicas, la aparición de esta sobreexpresión se encuentra entre el 40 al 50 por ciento en los carcinomas pulmonares cuyo resultado positivo ayuda al tratamiento de los inhibidores de tirosina quinasa. (Molina-Vila MA, 2008)

El FISH es un procedimiento de citogenética el cual necesita de los siguientes pasos para poder obtener un resultado eficaz y preciso los cuales son los siguientes:

- Preparación de las muestras: la utilización de los cortes histológicos para el uso del FISH en tejidos cuyo procedimiento histológico es el de rutina para el laboratorio de patología por lo cual es necesario el uso de fijadores de rutina para obtener el máximo de retención de las moléculas a estudiar del EGFR, es recomendable el uso de fijadores como el formaldehído al 4% el cual mantiene la integridad celular para el diagnóstico. (Dako, 2014)

Es importante tener en cuenta que el tiempo de fijación no debe excederse del tiempo establecido en el laboratorio ya que este puede desnaturalizar a las proteínas que se desean estudiar. (Dako, 2014)

Una vez que los tejidos sean fijados para el estudio se generara el procedimiento del laboratorio para poder obtener los bloques de parafina para la ejecución de los cortes de 1,5 micras de diámetro para la realización de la técnica de FISH.

- Pre tratamiento: Debido a que los ácidos nucleicos están normalmente rodeados de proteínas y la fijación propicia la unión entrecruzada de las proteínas celulares, es necesario hacer algunos pre tratamientos para permeabilizar las células y exponer las secuencias de interés en este caso el EGFR, el pre tratamiento se lo realiza con diferentes lavados y soluciones de pre tratamiento que son incluidas en el kit los cuales desenmascaran a las secuencias del EGFR, y facilita el acceso de las sondas marcadas para la hibridación. (Dako, 2014)

Para la hibridación de secuencias de ADN, el ADN de la muestra debe ser desnaturalizado el cual se lo consigue mediante el calentamiento de la muestra en una olla de incubación se debe tomar en cuenta las variaciones de tiempo y temperatura para utilizar las mejores condiciones de la desnaturalización y conseguir que las uniones inespecíficas desaparezcan, luego de este paso se emplea la pepsina para la eliminación de reacciones cruzadas antes de la hibridación con la sondas marcadas.

- Hibridación: La hibridación dependerá de la habilidad del ADN desnaturalizado de la sonda para realinearse con las cadenas complementarias del EGFR bajo las condiciones apropiadas y estando en un punto cercano a su punto de fusión ( $T_m$ ). El  $T_m$  es la temperatura a la cual la mitad del gen a estudiar está presente en la forma de cadenas simples (desnaturalizado), éste es directamente dependiente de la cantidad de material para hibridar. El  $T_m$  y la re naturalización del gen a estudiar son influidos de manera importante por cuatro parámetros: la temperatura, el pH. (Dako, 2014)

- Temperatura: Generalmente se sostiene que la tasa máxima de re naturalización (hibridación) del ADN es a  $25^{\circ}\text{C}$ , pero pueden haber algunas variaciones. Dependiendo los reactivos empleados y demás condiciones de hibridación, generalmente está entre  $16$  a  $32^{\circ}\text{C}$  por debajo del valor del  $T_m$ . (Dako, 2014)

- pH: Normalmente la tasa de re naturalización no se ve alterada por el pH, siempre y cuando su valor esté entre  $5$  a  $9$ . Generalmente se usan buffers con pH  $6.5 - 7.5$  pero se pueden usar pH mayores para producir condiciones más astringentes. (Dako, 2014)

Los anteriores factores determinan la astringencia o rigor de la hibridación la cual se define como el grado de especificidad en el apareamiento de la sonda con el gen a estudiar coloca una medida de la capacidad de reconocimiento mutuo de las dos secuencias. (Dako, 2014)

De este modo, entre más rigor tenga la hibridación solamente serán estables los híbridos que estén apareados completamente y viceversa. (Dako, 2014)

- Concentración de la sonda: La concentración de la sonda afecta la tasa a la cual se forman las primeras pares de bases, conocido como reacción de nucleación, lo cual es un

paso limitante en la hibridación. De este modo, a mayor concentración de la sonda, mayor la tasa de realineación. (Dako, 2014)

- Composición de la sonda: Las sondas con una mayor proporción de G-C tienden a formar uniones más estables, ya que estas dos bases forman enlaces con tres hidrógenos, a diferencia de las bases A-T que lo forman con dos. (Dako, 2014)

- Lavados post-hibridación: La sonda marcada puede hibridar no específicamente a secuencias con una homología cercana pero no enteramente homóloga a la secuencia de la sonda. Estos híbridos son menos estables que los híbridos perfectamente homólogos. Estos pueden ser disociados mediante lavados con la solución astringente, manipulando la concentración de sal y la temperatura; a concentraciones de sal más bajas y a altas temperaturas, mayor la astringencia del lavado. (Dako, 2014)

- Observación: Dependiendo del tipo de marcación empleado, para la observación de la señal se pueden usar los principales tipos de microscopios conocidos como son el de luz convencional, de campo oscuro, de fluorescencia o la microscopia electrónica de transmisión. Acoplados a estos sistemas también se pueden emplear sistemas computarizados de análisis de imágenes y de este modo obtener valoraciones 19 cuantitativas de la reacción de hibridación. (Dako, 2014)

Gracias a la utilización y la modificación de la técnica de acuerdo al laboratorio el FISH para la detección de las alteraciones genéticas en el EGFR han ayudado al laboratorio de patología del Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito para dar un diagnóstico en los pacientes que sufren con cáncer de pulmón para la ayuda del pronóstico para fármacos inhibidores del EGFR.

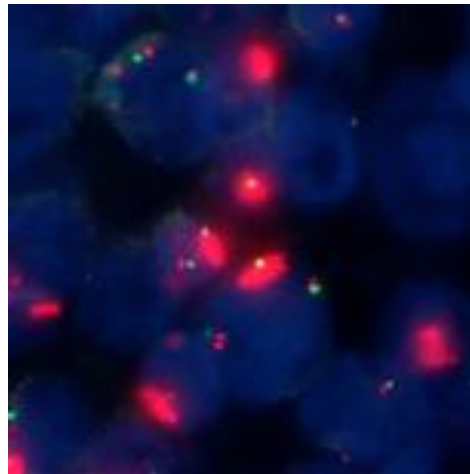


Imagen 2. Resultados del FISH (Dako, 2014)

## **CAPÍTULO IV**

### **6. MARCO METODOLÓGICO**

#### **6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El presente estudio de investigación que se elaboró en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) con el apoyo logístico y tutorial del Servicio de Patología en el área de inmunohistoquímica, planifico realizar un estudio cuasi experimental descriptivo y retrospectivo en biopsias bronquiales de pacientes que fueron atendidos HCAM en el año 2011 y 2012.

En el estudio se desea comparar la sobreexpresión del gen EGFR mediante la técnica de FISH en las biopsias bronquiales para correlacionar con los datos del tipo de cáncer y las causas que lo producen tales como sexo, edad, hábito tabáquico, y antecedentes familiares.

#### **6.2 POBLACIÓN Y/O MUESTRA**

La población de este estudio corresponde a las biopsias bronquiales positivas de malignidad de los pacientes que fueron atendidos en el servicio de patología del HCAM en los años 2011 y 2012.

La referencia estadística que ofrece el HCAM establece que en los años 2011 y 2012 fueron atendidos 590 pacientes los cuales 120 fueron positivos para cáncer de pulmón, de las cuales fueron procesadas 99 muestras por medio de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

#### **6.3 SISTEMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

##### **6.3.1 OBTENCIÓN DE DATOS**

- Se obtuvieron las muestras de los archivos de bloques y placas del servicio de patología del HCAM de los años 2011 y 2012 las cuales a través de la historia clínica del paciente se llegó a conocer los datos tales como: sexo, edad, hábito tabáquico, y antecedentes familiares.

- Se consiguieron los datos tales como: edad, sexo, hábito tabáquico, antecedentes familiares de las historias clínicas encontradas en el sistema interno de análisis de resultados los cuales se ingresaran por medio del área de Inmunohistoquímica del servicio de patología del HCAM.

### **6.3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO**

Procedimiento en las biopsias bronquiales positivas para la técnica de FISH

- Se obtuvo los bloques y placas de los archivos ubicados en primer piso del HCAM.
- Las placas positivas se marcaron en el lugar donde se encuentra las células atípicas de cada cáncer pulmonar.
- Una vez marcadas las placas en el bloque se marca con un marcador de tinta blanca de aceite el lugar indicado por la placa.
- Se realizó una base de datos en la cual indique el número del caso el lugar donde se colocara el micro arreglo y el tipo de cáncer al que se le diagnóstico.
- Se ingresa la base de datos en el Automated Tissue Microarrayer
- Se colocan los bloques marcados en la bandeja de donadores
- Se ubica el bloque de agarosa de micro arreglos en la bandeja de receptores
- Utilizando las bases de datos anteriormente mencionada, el Automated Tissue Microarrayer tomara las muestras de acuerdo a lo indicado.
- Una vez obtenidos los bloques de agarosa con las muestras se proceden a ejecutar los cortes en el micrótopo.
- Los cortes fueron de un diámetro 1.5  $\mu\text{m}$
- Se transporta a la estufa para luego proceder con la técnica de FISH

### **6.3.3 TÉCNICA DEL FISH:**

La técnica de FISH de acuerdo al kit EGRF FISH de la empresa DAKO la misma nos da la técnica de 2 días comprende en:

Día 1:

- Desparafinizar toda la noche en la estufa.
- Completar removiendo la parafina en xiloles y alcoholes desendentes hasta llegar al primer buffer de lavado (xilol 5', xilol 5', alcohol absoluto 2', alcohol absoluto 2', alcohol absoluto 2', alcohol 70% 3', alcohol 70% 3', wash buffer 3' por dos veces).
- Preparar la solución de pre tratamiento 15ml de solución en 300 ml de agua destilada, colocar en la cubeta la solución preparada.
- Colocar 500ml de agua destilada en la olla de presión, y colocar la cubeta con la solución.
- Precalentar la solución de 95° a 99°C para colocar las placas.
- incubar 121°C por un minuto
- Dejar enfriar a 90°
- Enfriar las placas a temperatura ambiente por 15' lavar con buffer
- Digestión enzimática con pepsina para eliminar los artefactos que pueden dañar la prueba durante 3' en temperatura desde los 2° a los 4°C.
- lavar con buffer por 3' por 2 veces a temperatura ambiente.
- Deshidratar las placas con alcoholes ascendentes (alcohol 70% 3' x 2 veces, alcohol absoluto 3' x 2 veces)
- Se colocan el gen que se desea estudiar que se encuentra en el kit para hibridar.
- Se coloca al equipo de hibridación el cual va a realizar la elongación e hibridación in situ durante 20 horas

Día 2:

- Se elaborara la astringencia de la muestra enseguida de la hibridación
- Se colocara la sonda para la observación y la tinción de la placa.
- Se situara las placas en la refrigeradora a una temperatura de 4 a 6 grados para la mantención de las sondas

Análisis de la técnica

- Se ubicara las placas en el microscopio de fluorescencia para que el médico patólogo lea la placa para el micro arreglo
- Las sobreexpresión del EGFR se la diagnostica con la presencia de más de dos señales rojas de fluorescencia en las células neoplásicas

- La lectura de la técnica cuya expresión tenga más de dos señales rojas en el núcleo celular para que el resultado sea positivo, se genera la lectura en 20 células cuyas características sean atípicas para los diferentes tipos de neoplasias malignas en el pulmón, Obteniendo el resultado de las 20 células se conformara el porcentaje en el que se encuentra la sobreexpresión del gen y se correlacionara los resultados con la historia clínica del paciente.

- La prueba se hará en cada bloque de arreglos, se colocaran controles positivos y negativos los cuales están avalados por la casa comercial, además de controles positivos y negativos de otros órganos que ya se han estudiado anteriormente cuyos resultados estén confirmados.

- La lectura de la técnica será leída por los patólogos cuyos conocimientos estén preparados para el análisis del área de molecular.

#### **6.4 ASPECTOS ETICOS**

La naturaleza del material de estudio (placas y bloques de archivo), hace difícil e innecesaria la obtención del consentimiento informado por parte de los pacientes, pero se guardará absoluta confidencialidad, respecto de la información obtenida de sus historias clínicas, utilizando exclusivamente para la elaboración de la presente Disertación, evitando la mención individualizada de la información de manera que no comprometa el derecho a la confidencialidad médica personal e institucional.

Para la exploración del estudio se obtendrá la autorización del Servicio de Patología del Hospital Carlos Andrade Marín para la utilización del material histopatológico de sus archivos, bajo las normas y procedimientos que determine la institución mencionada.

#### **6.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se incluyó los siguientes parámetros para este estudio:

- Pacientes atendidos en el HCAM en los años 2011 y 2012.
- Pacientes que tengan todos los datos completos en la historia clínica.
- Pacientes que tengan positividad en carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células gigantes.

## **6.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes que no fueron atendidos en el HCAM en los años 2011 y 2012.
- Pacientes que no tengan todos los datos completos en la historia clínica.
- Pacientes que no tengan positividad en carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células gigantes.

## **6.7 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Diagnósticos histológicos negativos
- Perdida de muestra o del bloque del tejido
- Diagnósticos incorrectos de malignidad.
- Muestra insuficiente para la realización del micro arreglo

Para el análisis estadístico se eliminaron estos diagnósticos ya que no eran resultados para la sobreexpresión del EGFR.

## **6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

- Una vez encontrados los casos de pacientes requeridos para la validez del trabajo investigativo se recolectó todos los datos clínicos como: Edad, Sexo, Hábito Tabáquico, Antecedentes Familiares.

- Para el análisis estadístico se incluyeron exclusivamente en el estudio los diagnósticos de sobreexpresión positivos y negativos como la técnica lo solicita, eliminando los casos sospechosos o insuficientes por no presentar diagnósticos fidedignos.

- Con los datos de la historia clínica como edad, sexo, hábito tabáquico, antecedentes familiares como los resultados de la prueba de FISH se procedió al análisis estadístico.

- Mediante el programa SSPV20 para la tabulación de datos y resultados mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando como valores  $\alpha=0.05$  y I.C= 95%,  $p=0.01$ .

- Para la realización del análisis de varianza se realizaron los siguientes test Prueba de Shapiro-Wilks para constatar la normalidad del comportamiento de los datos y el test de Levene para observar la homogeneidad de los datos.

## CAPÍTULO V

### 7. RESULTADOS

Se describen a continuación los resultados del trabajo investigativo.

#### 7.1 GÉNERO

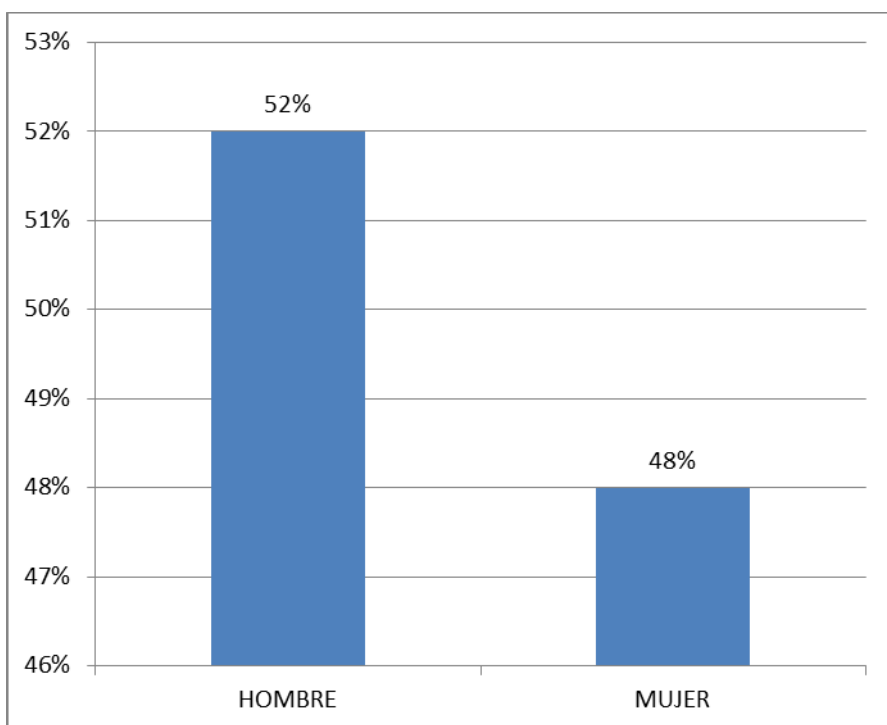


Gráfico N° 1. Frecuencia de neoplasias malignas de pulmón según género.

La frecuencia de neoplasias malignas de pulmón son mayores en hombres con un 52% en el caso de las mujeres corresponde al 48% de la información estudiada.

## 7.2 EDAD

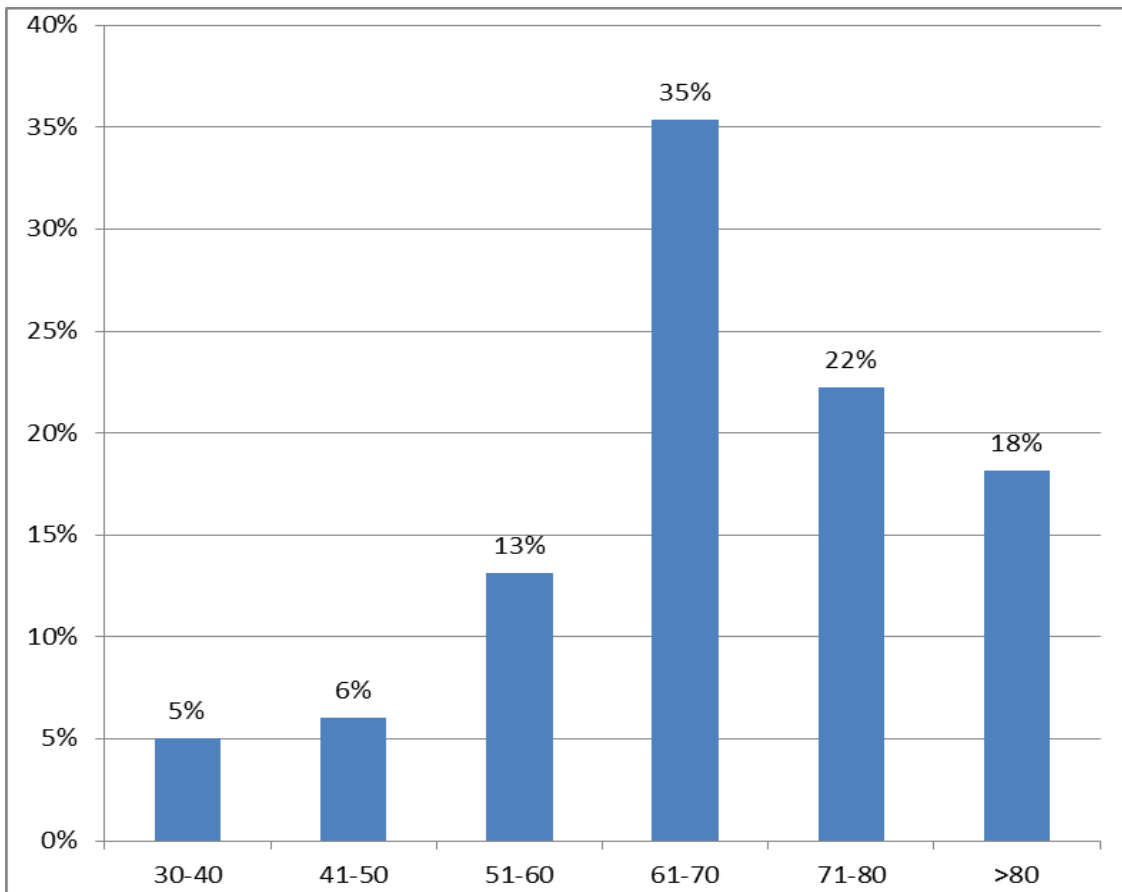


Gráfico N° 2. Distribución por grupos de edad de neoplasias malignas de pulmón.

La frecuencia es mayor en la edad de 61 a 70 años correspondiendo al 35% desde la quinta década la frecuencia de las neoplasias malignas de pulmón está presente en el 88% de la población estudiada.

### 7.3 HABITO TABAQUICO

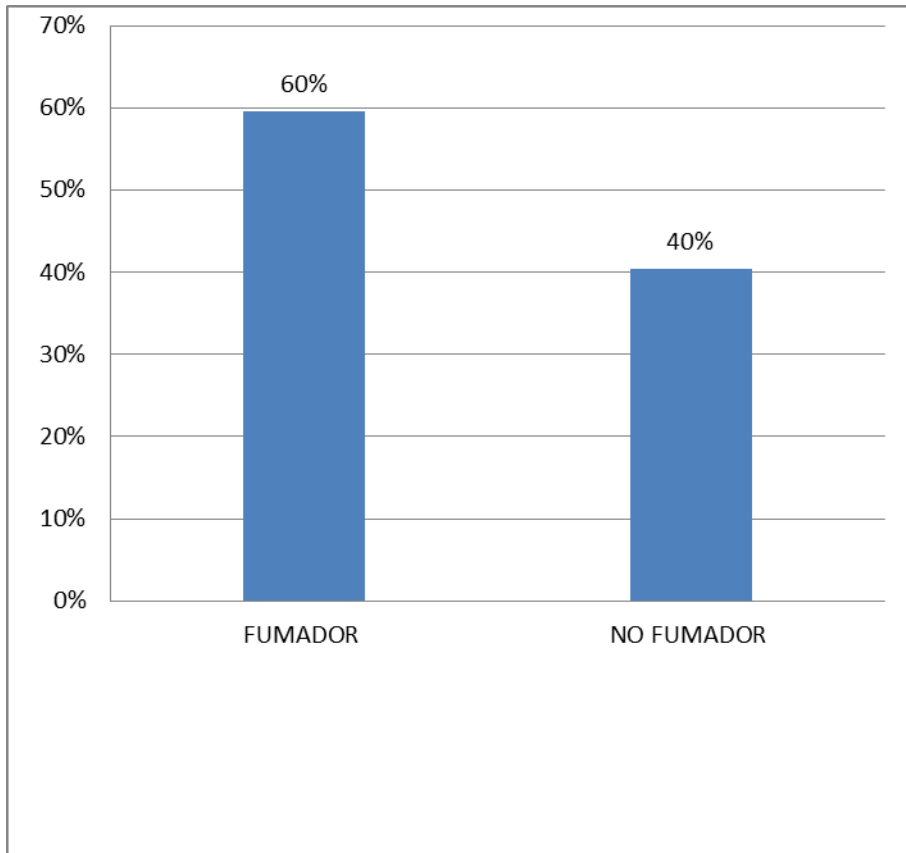


Gráfico N° 3. Frecuencia de neoplasias malignas de acuerdo al habito tabaquico.

La frecuencia de neoplasias malignas de pulmón de acuerdo al hábito tabáquico es mayor con un 60% de los fumadores respecto al 40% de personas no fumadoras en los casos estudiados.

## 7.5 ANTECEDENTES FAMILIARES

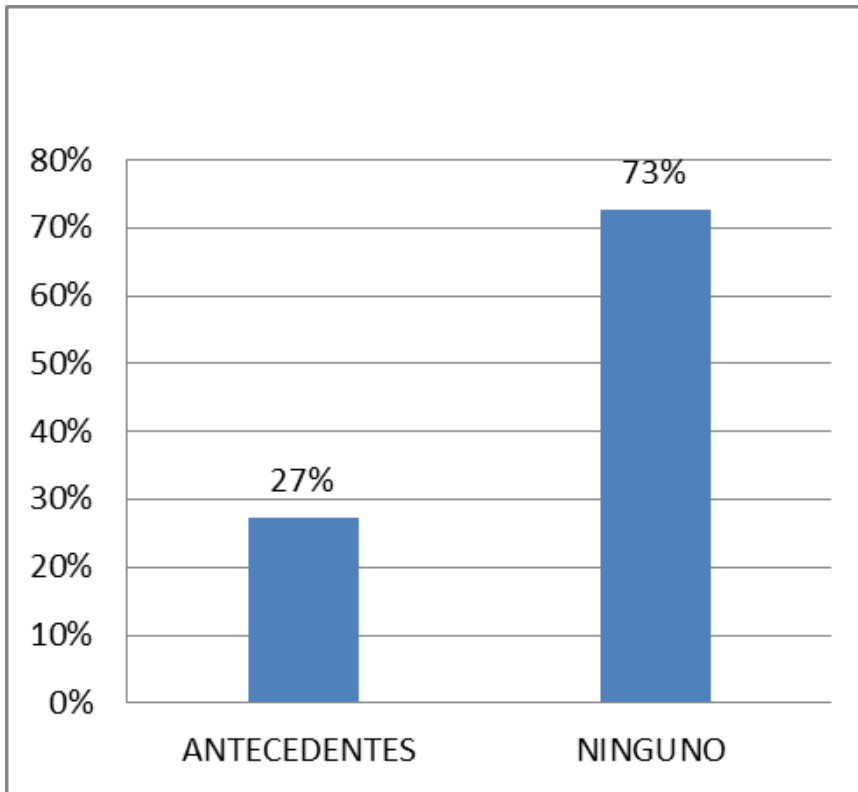


Gráfico N° 4. Frecuencia de neoplasias malignas de acuerdo los antecedentes familiares.

La frecuencia de neoplasias malignas según los antecedentes familiares, es menor con un 27% a diferencia de pacientes que no tienen ningún antecedente familiar con cáncer de pulmón generando un 73%, debido a otros factores.

## 7.6 TIPO DE CANCER

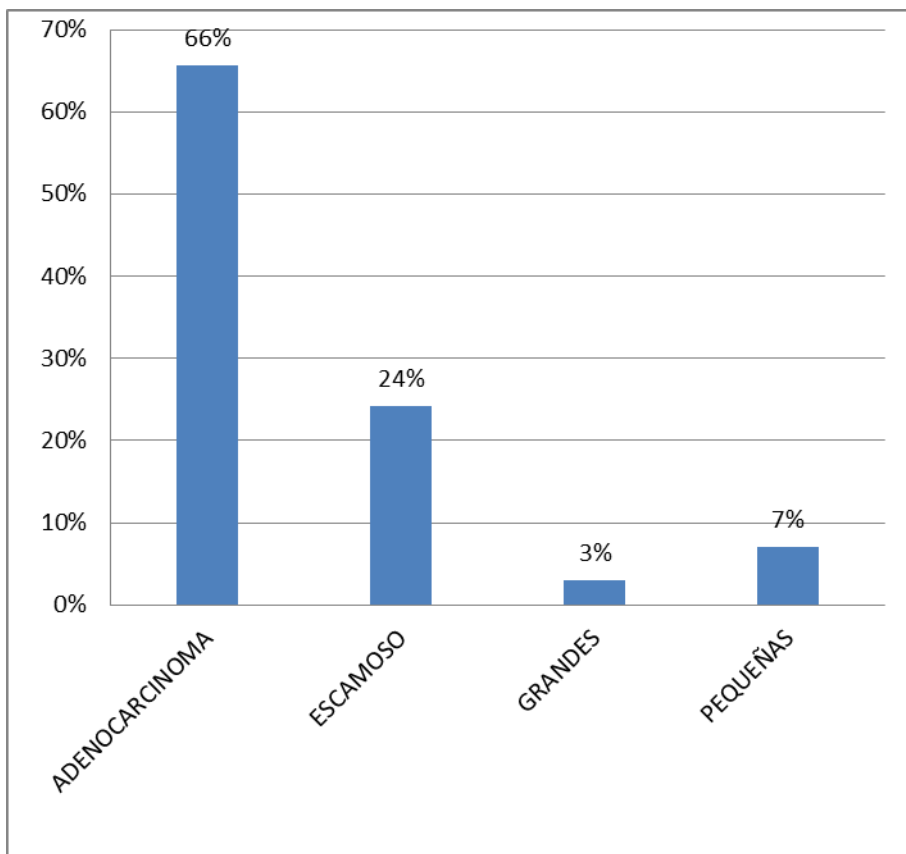


Gráfico N° 5. Frecuencia de neoplasias malignas de acuerdo al tipo de cancer.

La frecuencia de las neoplasias malignas de los casos estudiados en mayor cantidad se encuentra el adenocarcinoma con el 66%, seguido por el carcinoma escamoso con un 24% consecutivamente se encuentra el carcinoma de células pequeñas con un 7% y el de células grandes se manifiesta en un 3%, estos resultados se dieron de acuerdo a los criterios histológicos que se manejan en el Hospital Carlos Andrade Marín.

## 7.7 DIAGNÓSTICOS DE SOBREENPRESIÓN DEL EGFR MEDIANTE FISH

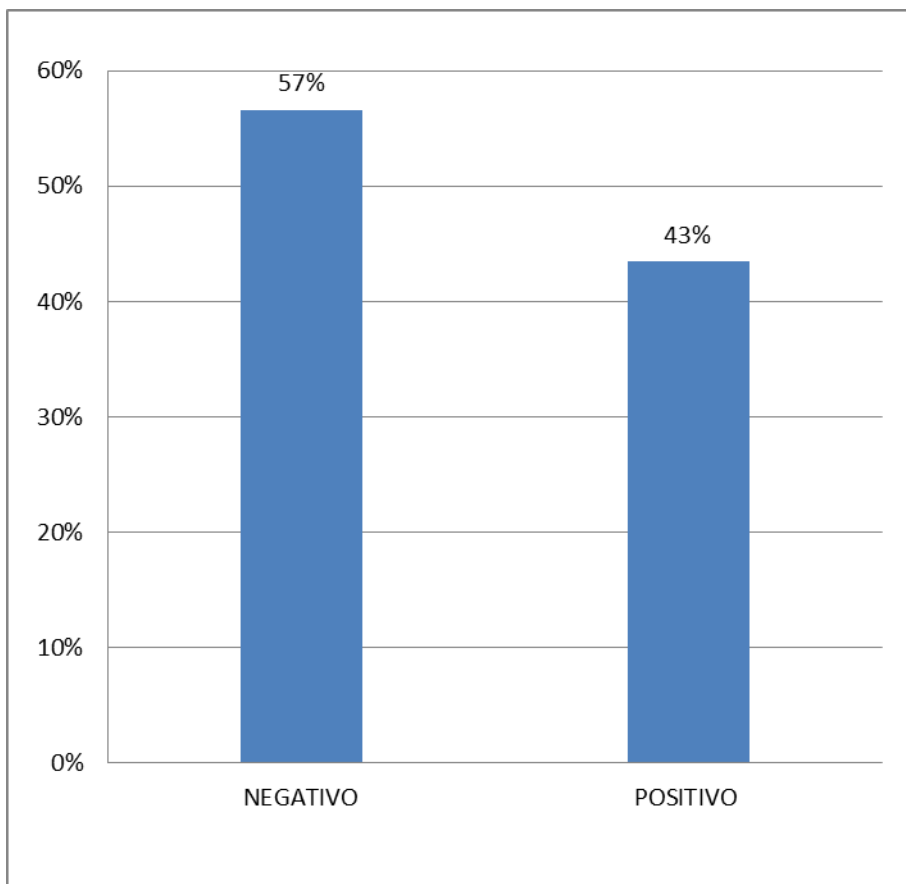


Gráfico N° 6. Sobreexpresión de EGFR.

La sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH dio como resultado un de positivos del 43% de los casos estudiados, la sobreexpresión del EGFR

## 7.8 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREEXPRESIÓN DE EGFR POR TIPO DE CANCER

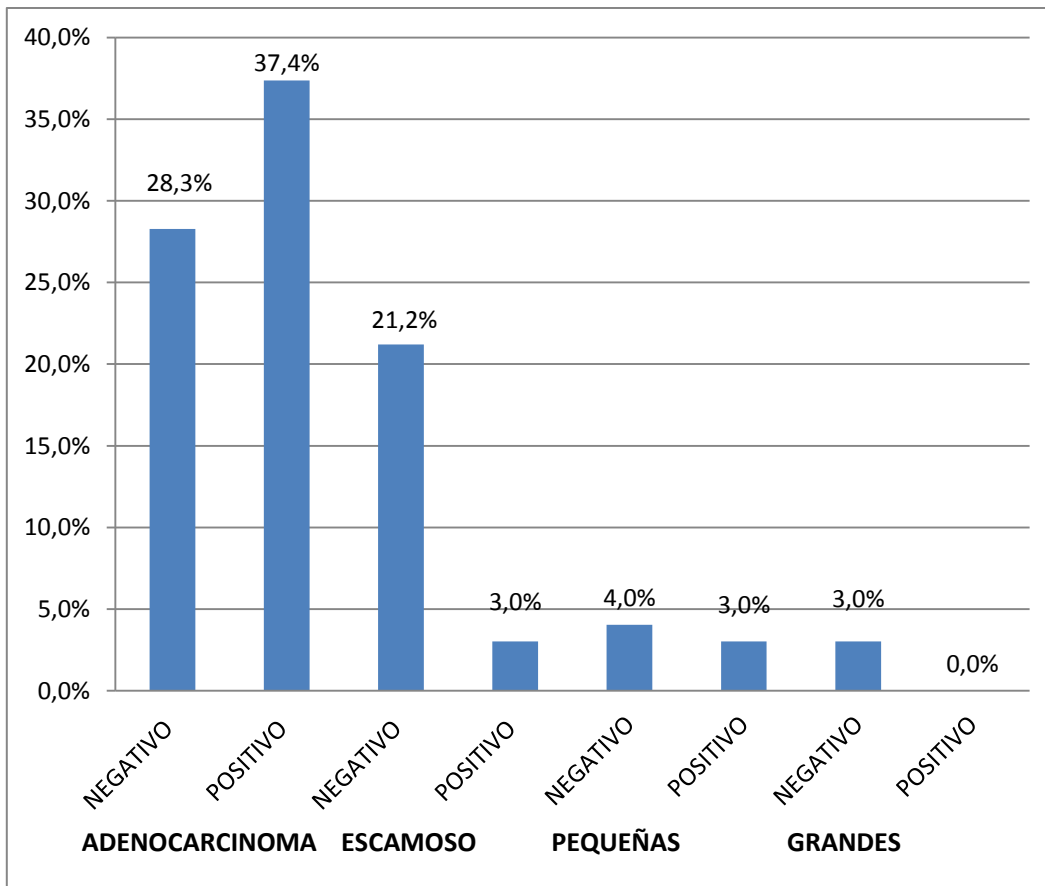


Gráfico N° 7. Correlacion de Sobreexpresion de EGFR con Tipo de cancer

En el estudio realizado la mayoría de los casos cuyos resultados son positivos son los adenocarcinomas con un 37,4% de la población estudiada, sucesivos por los carcinomas escamosos y de células pequeñas con un 3% cada uno, los carcinomas de células grandes ninguno de los casos estudiados genero resultado positivo para la sobreexpresión de EGFR en pacientes que sufren cáncer de pulmón.

Subsiguientemente los resultados negativos fueron los adenocarcinomas con un 28,3%, los carcinomas escamosos con un 21,2% obteniendo la mayor parte de casos negativos en el carcinoma escamoso, carcinomas de células pequeñas con un 4% y de células grandes con un 3% conformando el total de pruebas estudiadas negativas.

## 7.9 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR EDADES

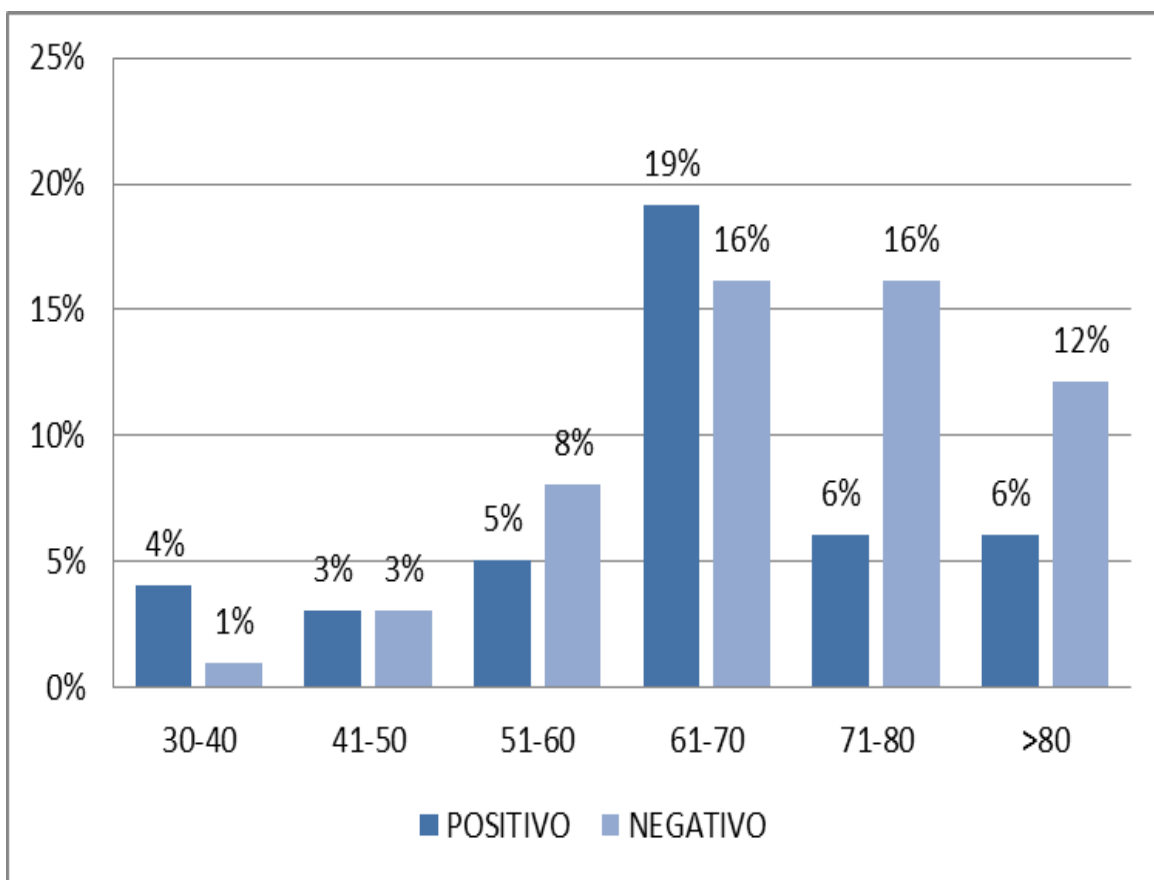


Gráfico N° 8. Correlacion de Sobreexpresion de EGFR con edades.

La frecuencia de sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH se presenta en mayor cantidad a partir de 51 años en adelante y para la década de los 60 con un 19% de los pacientes estudiados.

## 7.10 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR GÉNERO

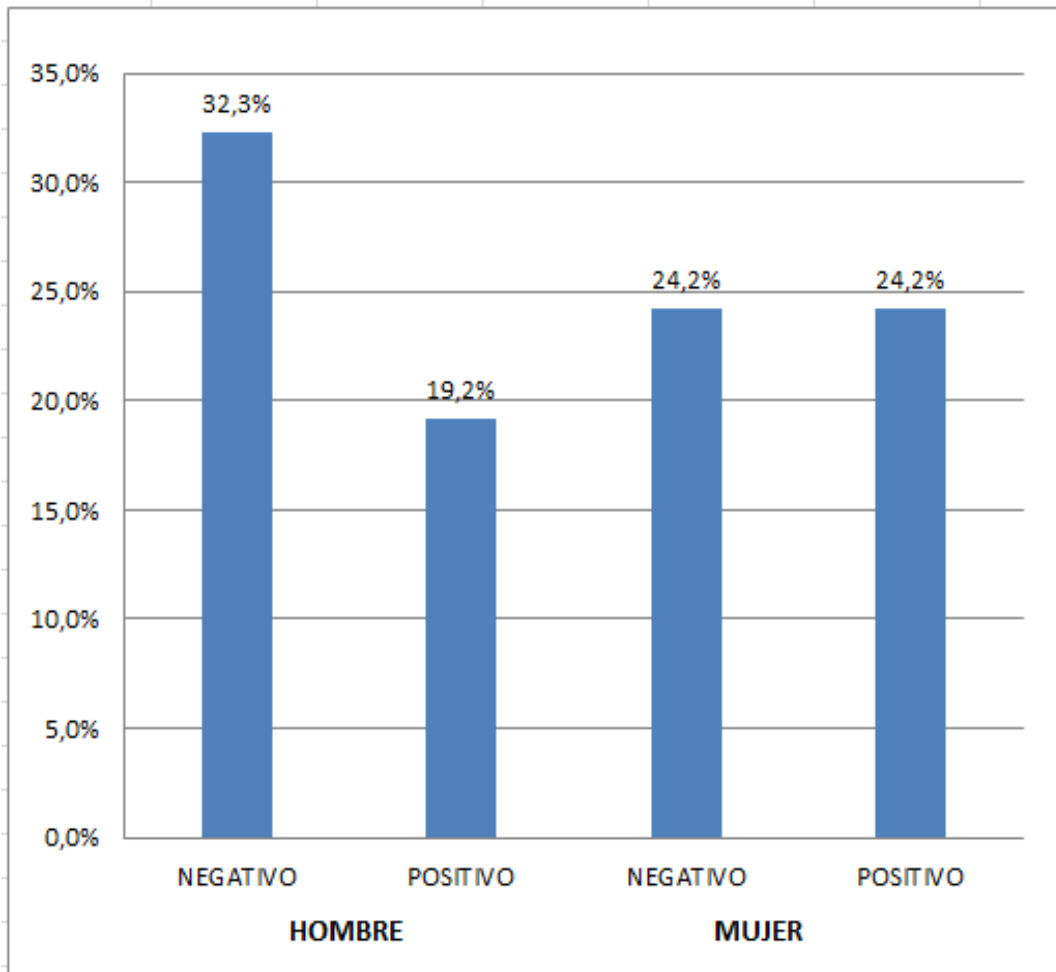


Gráfico N° 9. Correlacion de Sobreexpresion de EGFR con Genero.

La frecuencia sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH dio como positivo 19,4% en pacientes de sexo masculino a diferencia de las pacientes con sexo femenino que dio como resultado el 24% de la población estudiada.

### 7.11 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREENPRESIÓN DE EGFR POR HABITO TABAQUICO

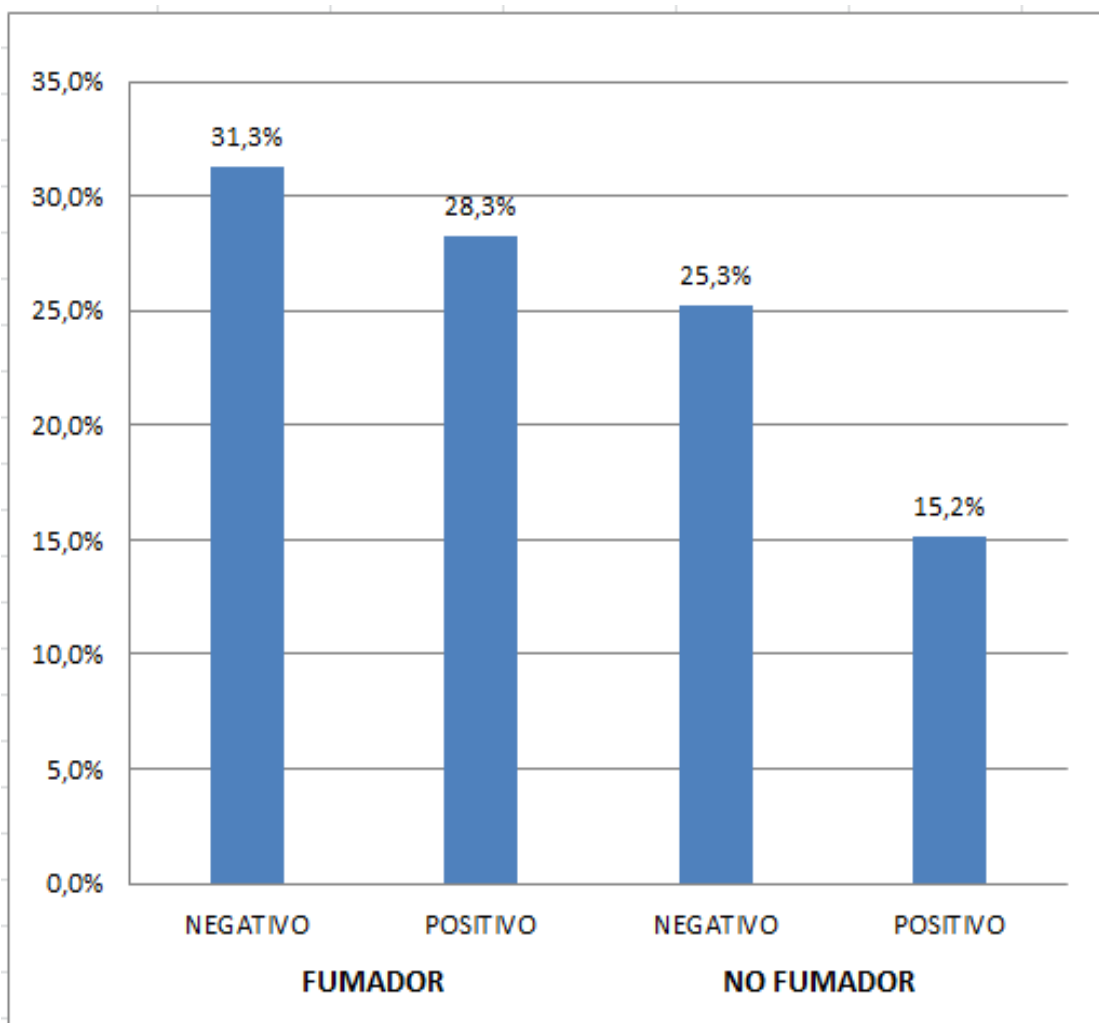


Gráfico N° 10. Correlacion de Sobreexpresion de EGFR con Hábito tabáquico.

La sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH obtuvo como resultado positivo en mayor grado en pacientes fumadores con 28,3% a diferencia de los pacientes no fumadores que tuvo como resultado 15,2% de las muestras estudiadas.

### 7.12 CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA DE SOBREEXPRESIÓN DE EGFR POR ANTECEDENTE FAMILIAR

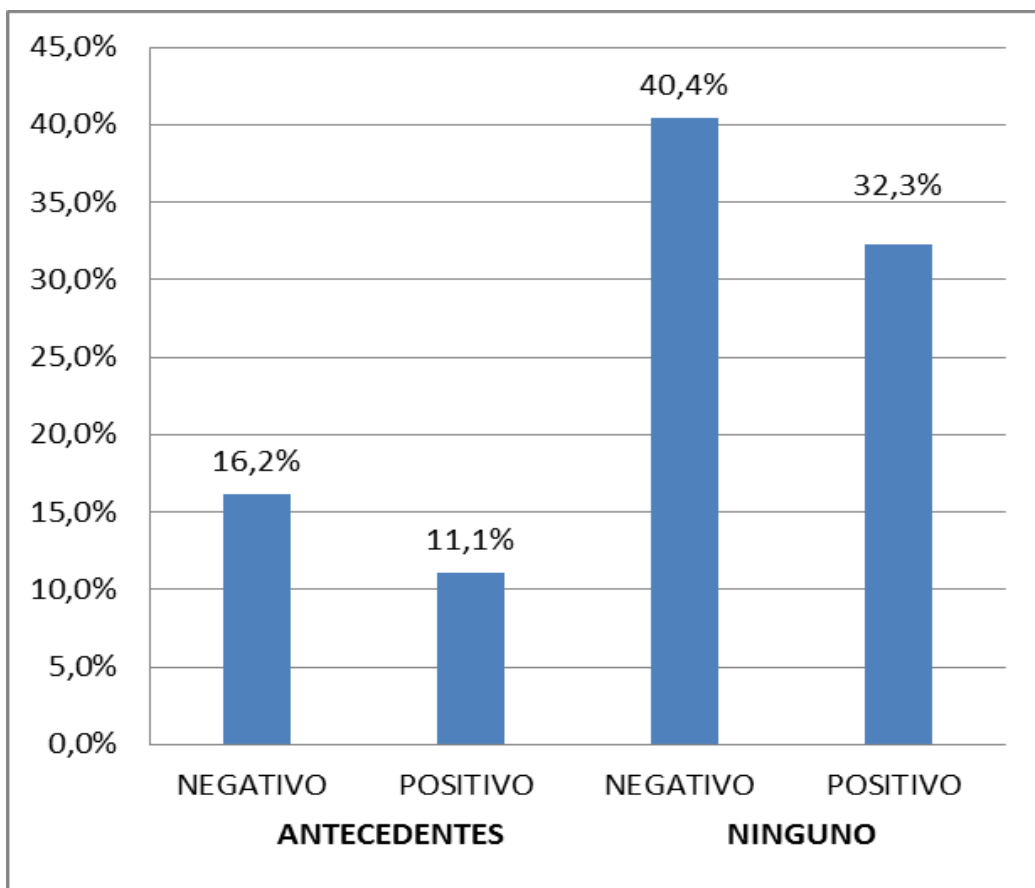


Gráfico N° 11. Correlacion de Sobreexpresion de EGFR con Antecedente familiar.

La sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH dio como resultado en mayor número de pacientes que no han tenido algún antecedente familiar generando el 32.3% y el 11.1% de los pacientes que en su historia clínica ha tenido familiares que han sufrido de esta enfermedad fue menor.

## CAPÍTULO VI

### 8. DISCUSIÓN

En los últimos años la incidencia de las neoplasias malignas de pulmón en la ciudad de Quito, se ha tenido un incremento en tanto en mujeres como en hombres, debido al consumo de tabaco la cual conduce a la exposición de sustancias carcinógenas. Estas neoplasias se encuentran en edades desde los 50 a los 85 años de edad como se ha podido demostrar en el estudio realizado. (Cueva, 2009)

El estudio del diagnóstico histológico mediante biopsias bronquiales tiene gran importancia en la detección oportuna de las neoplasias malignas sean estas sintomáticas o no, ya que esta detección tienen gran importancia para poder realizar los tratamientos oportunos y adecuados para los pacientes. Es por ello que el estudio diagnóstico de genética molecular de la sobreexpresión del EGFR en cáncer de pulmón mediante la técnica de FISH ha logrado una gran importancia en la detección del gen. (CNI, 2009)

En los últimos años el avance de las técnicas de diagnóstico tanto convencional y molecular han avanzado notablemente de tal manera el diagnóstico de la sobreexpresión ha facilitado en gran medida, para no esperar un gran tiempo para poder tener resultados confiables y precisos. Una de estas técnicas de detección es el uso de la técnica de FISH, la realización de esta técnica es confiable y de fácil reproducción logrando realizar el estudio con diferentes genes en el mismo momento lo cual puede brindar una viabilidad en el diagnóstico y a un menor tiempo a diferencia de otras técnicas moleculares. (CNI, 2009)

Para la realización de esta disertación se obtuvo muestras de 120 pacientes que fueron atendidos en el Hospital Carlos Andrade Marín gracias a los criterios de inclusión y exclusión se tomaron 99 muestras para evitar riesgos estadísticos quedando estas muestras como población de estudio, tomando en cuenta detalles como edad, sexo, el tipo del cáncer de pulmón el hábito tabáquico y los antecedentes familiares. Estos datos fueron tomados de las historias clínicas de los pacientes siendo importantes para la investigación realizada.

En la investigación realizada la edad de los pacientes con neoplasias malignas de pulmón se presentan con una frecuencia que van desde los 40 años en adelante con un disposición más habitual entre los 60 a los 70 años de edad llegando a ser esta década la de mayor prevalencia en las neoplasias de pulmón siendo un factor el aumento de la edad para adquirir la enfermedad ya que existe un deterioro progresivo que sufren las células pulmonares por la exposición a sustancias tales como el tabaco a lo largo de la vida. Teniendo una sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH se presenta el 19% se encuentran en las edades de 60 a 70 años, correlacionándose con las edades donde

los pacientes tiene una mayor disposición a sufrir las neoplasias malignas de pulmón. (Gorlova, 2013)

Con respecto al sexo el 52% de las neoplasias malignas de pulmón fueron hombres mientras el 48% fueron mujeres es decir que estas neoplasias malignas se encuentran de una misma forma tanto en hombres como en mujeres. Es decir que esta neoplasia estuvo afectando de igual forma tanto en hombres como en mujeres solo con una diferencia del 4%. Por lo contrario los hombres se presentaron un 32,3% de sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH en los hombres a diferencia de las mujeres las cuales presentaron un 24,2% con una diferencia del 8% por el sexo. Estos datos se correlacionan con datos obtenidos con investigaciones realizadas en diferentes países que tienen las condiciones de vida iguales a nuestro país gracias a esto ayuda a dar la validez a la investigación realizada. (Cappuzzo, 2005)

En el estudio hábito tabáquico se observó una superioridad entre los individuos fumadores he individuos no fumadores que sufren neoplasias malignas de pulmón cuyos resultados dieron un 60% de la población afectada con la enfermedad mientras que el 40% correspondió con los pacientes no fumadores. Estos Datos podemos observar que la mayoría de los pacientes fueron fumadores activos esto es por ello que aumenta el riesgo de presentar neoplasias malignas del pulmón. En esta investigación se observa una vez más que el tabaco es uno de los factores de riesgo con mayor relevancia para adquirir el daño en las células del pulmón siendo la causa mayoritaria en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Con relación a los pacientes que presentaron sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH el 28.3% dio un resultado positivo en pacientes fumadores mientras que el 15.2% de los pacientes que no fuman. En este caso de la investigación la mayoría de los casos de los pacientes que tuvieron resultados negativos de la sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH. (Soto, 2013)

Con relación a los antecedentes familiares de los pacientes que sufren esta enfermedad fue el 73% de pacientes que no tienen antecedentes de neoplasias malignas de pulmón lo cual indica que el tumor es debido a causas diferentes como el tabaquismo. Caso contrario ocurre con un 27% de pacientes que han sufrido neoplasias malignas de pulmón tienen un antecedente familiar de neoplasias en pulmón, de acuerdo a investigaciones anteriores los datos obtenidos son iguales a los obtenidos. Con relación a los pacientes un 32,3% de los resultados de sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH con de pacientes que en su familia no ha sufrido alguna neoplasia maligna de pulmón y se presenta por primera vez y un 11.1% de pacientes que cuya familia tiene algún antecedente con neoplasias malignas de pulmón en su familia. (Makoto Maemondo, 2010).

Con respecto al tipo de cáncer pulmonar la mayoría de pacientes presentaron adenocarcinoma de pulmón con un 70%, el carcinoma escamoso con un 24%, el carcinoma de células pequeñas mientras apenas el 3% corresponde a carcinoma de células grandes. Cabe indicar que de igual manera el adenocarcinoma con un 37,4% presento mayor sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH cuyos resultados se correlacionaron con estudios anteriores, de igual forma el carcinoma escamoso de

pulmón y el carcinoma de células pequeñas tiene una igual sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH con un 3% y no hay sobreexpresión con carcinoma de células grandes de pulmón estos resultados se correlacionaron con las investigaciones realizadas hacia este gen.

El gen EGFR está frecuentemente sobre expresado no solo en los individuos que tienen una neoplasia maligna de pulmón sino también se encuentra asociado a otras neoplasias como por ejemplo los carcinomas de cabeza y cuello, de vejiga, cerebro, mama, colon. (Makoto Maemondo, 2010).

En cuanto a investigaciones de la sobreexpresión de este gen en el cáncer de pulmón se ha demostrado que las mutaciones del dominio tirosina quinasa son marcadores sensibles a inhibidores tirosina quinasa tomando en cuenta la importancia en el ciclo celular el gen de sobreexpresión del EGFR en el cáncer de pulmón ha sido de mucho interés en el ámbito farmacéutico para tratamiento para inhibir la actividad tirosina quinasa como el Tarceva (Erlotinib) de Roche estos tratamientos compiten con las moléculas de ATP para enlazarse en los sitios de unión del dominio tirosina quinasa de las células cancerígenas gracias a esto los tratamientos presentan beneficios en cuanto a la sobrevivencia del paciente. (Roche, 2014)

Se ha reportado que los tratamientos de cáncer de pulmón con inhibidores de tirosina quinasa han ayudado en un 80% en pacientes que se ha detectado la sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH y un 10% en pacientes que no existe ninguna sobreexpresión del EGFR. (Roche 2014)

Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que el diagnóstico de la sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH ayuda a la detección y posterior tratamiento con el uso de inhibidores de tirosina quinasa para el cáncer de pulmón. En esta investigación la detección de la sobreexpresión del EGFR mediante la técnica de FISH en pacientes con cáncer de pulmón es de gran importancia para realizar futuros estudios en la detección de diferentes genes que se encuentran en el cáncer de pulmón.

## **9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **9.1 CONCLUSIONES**

- Las neoplasias malignas de pulmón son más frecuentes en ambos géneros tanto en el masculino como en el femenino y en especial a partir de los 40 años, con más prevalencia en la década de los 60, en personas fumadoras.
- En la población estudiada la sobreexpresión del EGFR que se diagnostican por la técnica de FISH son generalmente en pacientes valorados con carcinomas no microcítico de pulmón.
- La sobreexpresión del EGFR mediante FISH en adenocarcinoma asignaron datos significativamente más altos en relación a los carcinomas escamosos, células pequeñas. En tanto el carcinoma de células grandes asigno datos nulos de sobreexpresión de EGFR.
- El FISH es una técnica muy útil para la detección de la sobreexpresión con una alta eficiencia o exactitud; siendo la especificidad y el valor predictivo negativo los más altos en el presente trabajo; por tal motivo es una técnica útil para la selección de los pacientes que deben ser tratados quirúrgicamente.
- El FISH debe ser considerada como un complemento para el diagnóstico molecular y no como una sustitución de la misma hasta lograr la experticia manejada en otros países.
- El trabajo conjunto con el FISH y el diagnóstico histológico ha demostrado una alta correlación diagnóstica y ha servido para un futuro tratamiento con los pacientes.

### **9.2 RECOMENDACIONES**

- El FISH debe recomendarse como la mejor opción para el diagnóstico de sobreexpresión de EGFR, debido a que los hallazgos que contribuyen significativamente para un posterior tratamiento.
- La capacitación continua de esta técnica de los médicos patólogos, y licenciados en patología contribuirá a la obtención de mejores resultados pudiendo ser reproducibles dentro del servicio de patología por ser una técnica de gran valor e importancia.

- Realizar el seguimiento de los pacientes diagnosticados de sobreexpresión de EGFR, en especial a los pacientes que van a un tratamiento con inhibidores de este gen, para comparar con el diagnóstico posterior al tratamiento, esto es muy importante en los casos en que la sobreexpresión presenta un diagnóstico definitivo, así se podrá valorar el aporte del FISH en estos casos.
- Los hallazgos de sobreexpresión de EGFR en pacientes de cáncer de pulmón pueden contribuir a la selección de los pacientes idóneos para elaborar el tratamiento adecuado. En especial con pacientes de adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células pequeñas.
- El FISH debe ser introducida dentro del protocolo de trabajo que se utiliza para evaluar el diagnóstico de EGFR en cáncer de pulmón como de otros órganos.
- Elaborar estudios posteriores para la identificación de la translocación del GEN ALK en pacientes con cáncer de pulmón.
- Proyectar estudios comparativos en posteriores con la sobreexpresión de EGFR y ALK por FISH y otras técnicas para el diagnóstico pulmonar.

## 10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA Y PÁGINAS WEB

### 10.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJCC. (2004). AJCC Manual de diagnóstico de extensión del cáncer. Clasificación TNM de los tumores malignos (Sexta ed.). Barcelona, España: Ediciones Mayo.

Blanco, I. (lunes 21 de noviembre de 2011). Oncología Clínica Básica. (A. Ediciones, Editor, & J. G. Conde, Productor)

Bloom. (2001). Compendio de Histología.

Cappuzzo F, H. F. (2005). Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. J Natl Cáncer Inst.

Cueva, P. Y. (JUNIO, 2009). Epidemiología del cáncer en Quito. Quito: Registro Nacional de Tumores SOLCA Quito.

D. Isla, R. L. (2011). Abordaje terapéutico del carcinoma de pulmón no microcítico. Revista de oncología, 8-15.

Dako. (2014). EGFR pharmDx™ Package Insert. Inserto.

DeMay, R. (2012). Clinical Pathologists. Respiratory Cytology. Chicago, EEUU: American Society of Clinical Pathologists.

Dickson, R. L. (1992). "Molecular Determinants Of Growth, Angiogenesis, And Metastases In Lung Cancer". *Seminars In Oncology*, 19(3).

Erozan YS, F. J. (2007). Cytopathologic Diagnosis of Cancer in Pulmonary Material: A Critical Histopathology Correlation. . Acta Cytol.

Eynard, A. V. (2008). Histología Y Embriología Del Ser Humano/ Histology and Embryology of the Human Being: Bases Celulares Y Moleculares/ Cellular and Molecular Basis. Ed. Médica Panamericana.

Gómez, José Javier. J. d. (octubre 2011). Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma pulmonar no microcítico. España: Elsevier España.

González, J. I. (2012). Actualización del tratamiento biológico en cáncer de pulmón. Hospital general universitario gregorio marañón. Madrid.

Gorlova OY, Z. Y. (2013). Estudio de casos. Revista de Patología Respiratoria, 30-60.

Herf SM, (2003) Complications of Transbronchial Lung Biopsies

INEC. (2001). Anuario De Estadísticas Vitales: Nacimientos Y Defunciones. En I. N. Censos. Quito, Ecuador.

J. P. RODRIGO TAPIA<sup>1</sup>, F. D. (2011). Amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico y expresión de la e-cadherina en los carcinomas de cabeza y cuello. . HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS.

Johnston. (2001). Cytologic Diagnosis of Lung Cancer: Principles and Problems. . Chicago: Pathol Res Pract.

Johnston. (2005). Histologic and Cytologic Patterns of Lung Cancers in 2,580 Men and Women Over a 15-Year Period. Mishigan.

Kumar, V. (2005). Patología estructural y Funcional. España: Elsevier.

López, A. – Cortez, M. j.-y.-M. (2001). Polimorfismos genéticos y su asociación. Instituto de investigación Biomédicas Facultad de Ciencias de la Salud Universidad.

López-Ríos, D. F. (2010). Determinación de EGFR en carcinoma de pulmón. Revista especializada en la salud, 1-3 caso 7.

Lozowski W, H. S. (2001). Cytomorphology of Carcinoid Tumors. . Acta Cytol.

Makoto Maemondo, M. P. (2010). Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. The New England Journal of Medicine, 6-15.

Mitsudomi T, K. T. (s.f.). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. J Clin Oncol.

Molina-Vila MA, B.-A. J. (2008). A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. J Thorac Oncol.

Montero, Claudio (2008). Manual teórico practico de técnicas inmunohistoquímicas. Departamento de Nariño Colombia: universidad de san Luis de Potosí.

Neville, M. (2001). Anatomy And Physiology Of Lactation. *Ped Clin North Amer*, 1(13)

Octavio Zerecero Carrion, A. V. (2012). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (egfr) y su relación con el cáncer. Revista especializada en ciencias de la salud.

Pardo, M. (1996). *Anatomía Patológica*. España: Elsevier .

Patricia Cueva, J. Y. (junio 2009). Patricia Cueva, José Yép Epidemiología del cáncer en Quito. Quito: Registro Nacional de Tumores SOLCA.

Paulina, R. (2007 ). Histología-Texto Atlas con Biología Celular y Molecular . Mexico: Panamericana.

Pérez, J. C. (2006). El receptor de egf (egfr): una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y sus inhibidores. Biocancer.

- Quiroz, G. (1985). Anatomía Humana (26va. ed.). México, D. F.: Editorial Porrúa S.A.
- Rancés Blanco Santana, M. M. (2013). Detección inmunohistoquímica del receptor del factor de crecimiento epidérmico: revisión de algunos aspectos técnicos relacionados. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 1-30.
- Robbins, K. A. (2008). Patología estructural y funcional Saunders. 7ma Edición.
- Rodríguez Costa, A. V. (2005). Cuadernos de Citopatología. Aparato respiratorio II: Patología inflamatoria. Patología tumoral. Madrid: Editorial Díaz de Santos.
- Rubín Emanuel, D. S. (2012). Patología de Rubín: Fundamentos Clinicopatológicos En Medicina (6 ed.). McGraw-Hill: Interamericana.
- Roche (2014). Tarceva (Erlotinib) For the treatment of patients with lung and pancreatic cancer. Roche Ecuador.
- Ruy Pérez Tamayo, E. L. (2007). Principios de Patología. (4 ed.). Panamericana.
- Soto Ana, M. L. (2013). Cáncer de Pulmón en no Fumadores. Marge.
- VARGAS, J. A. (junio 2010). Receptor del factor de crecimiento epidérmico y cáncer. Optar al Doctorado en Ciencias Médicas.

## 10.2 PÁGINAS WEB

- CNI. (s.f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado el 05 de Oct. de 2009, de <http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=46409>
- DEF, D. (s.f.). Definiciones. Recuperado el 05 de Oct. de 2009, de [www.definicion.org](http://www.definicion.org)
- Dfarmacia.com. (Enero de 2014). dfarmacia.com. Obtenido de [http://www.jano.es/farma/ctl\\_servlet?f=37&id=13076827](http://www.jano.es/farma/ctl_servlet?f=37&id=13076827)
- DICCIOMED. (s.f.). *Universidad* se *Salamanca*, <http://dicciomed.eusal.es/palabra/pronostico>.
- Taus, Álvaro, I. V. (Octubre de 2011). Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. Recuperado el 24 de Febrero de 2014, de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1699885511001565?via=sd>
- Vaquero, & Manuel. (26 de Febrero de 2013). Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica. Obtenido de [http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-sida01/es/contenidos/informacion/hd\\_publicaciones/es\\_hdon/adjuntos/ManualInmunohistoquimica.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-sida01/es/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/ManualInmunohistoquimica.pdf)

Zudaire, I. (2008). DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE FICTION COMO NUEVA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE PULMÓN. Recuperado el 5 de Marzo de 2014, de Depósito académico de la universidad de Navarra: <http://dspace.si.unav.es/dspace/handle/10171/19812>

## 11. ANEXOS

### 11.1 EQUIPOS UTILIZADOS PARA MICROARREGLOS




Equipo Automated Tissue Microarrayer para la realización de micro arreglos del servicio de patología del HCAM

## 11.2 MICROARREGLOS PARA ESTUDIO

AREA DE PATOLOGIA MOLECULAR      HOSPITAL CARLOS ANTONIO MARIN      SERVICIO DE PATOLOGIA      FO-PAT-02      VERSION 01

| REGISTRO DE IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS EN BLOQUES DE MICROARREGLO |   |                             |                             |  |  |  |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|--|--|--|
| FECHA:  | 11/04/2014                              |                             | BLOQUE RECEPTOR             | COMPLETO <input type="checkbox"/>        | DIVIDIDO <input checked="" type="checkbox"/> | ID BLOQUE RECEPTOR: 2014041001/20140411002 |
| DIÁMETRO DE POCILLO:  | 3mm <input checked="" type="checkbox"/> | 2m <input type="checkbox"/> | 1m <input type="checkbox"/> | Nro. PUNCH POR MUESTRA: 1 muestra        |  | OPERADOR: Yb. Sebastian López              |
| SECCIÓN A. ID BLOQUE:   |   | SECCIÓN B. ID BLOQUE:       |                             |  | PROCESO TÉCNICO APLICADO                     |  |
| 21877-11  | 4322-11                                 | 9386-11                     | 13809-12                    | 11714-12                                 | 3365-12                                      | MICRODISECCIÓN LASER                       |
| 22817-11  | 3135-11                                 | 22101-11                    | 15823-12                    | 13533-12                                 | 22221-12                                     | COLORACIÓN H-E                             |
| 22682-11  | 7283-11                                 | 19685-11                    | 16185-12                    | 14585-12                                 | 21308-12                                     | COLORACIÓN ESPECIAL                        |
| 28849-11  | 31406 <sup>P</sup>                      | 5491 <sup>N</sup>           | 28143-12                    | 31491-12                                 | 28949-12                                     | IHQ - FISH *                               |
| 8831-12   | 8817-12                                 | 8819-12                     | 31041-12                    | 31406-13                                 | 5491 <sup>P</sup>                            | EXTRACCIÓN DNA                             |
| /   | /                                       | /                           | /                           | /  | /  | OTROS                                      |
| RESUMEN DE PROCESAMIENTO  |   | NRO. PLACAS                 | NRO. TUBOS                  | RESPONSABLE DEL PROCESO TÉCNICO APLICADO |  |  |
| OBSERVACIONES   |   |                             |                             |  |  |  |



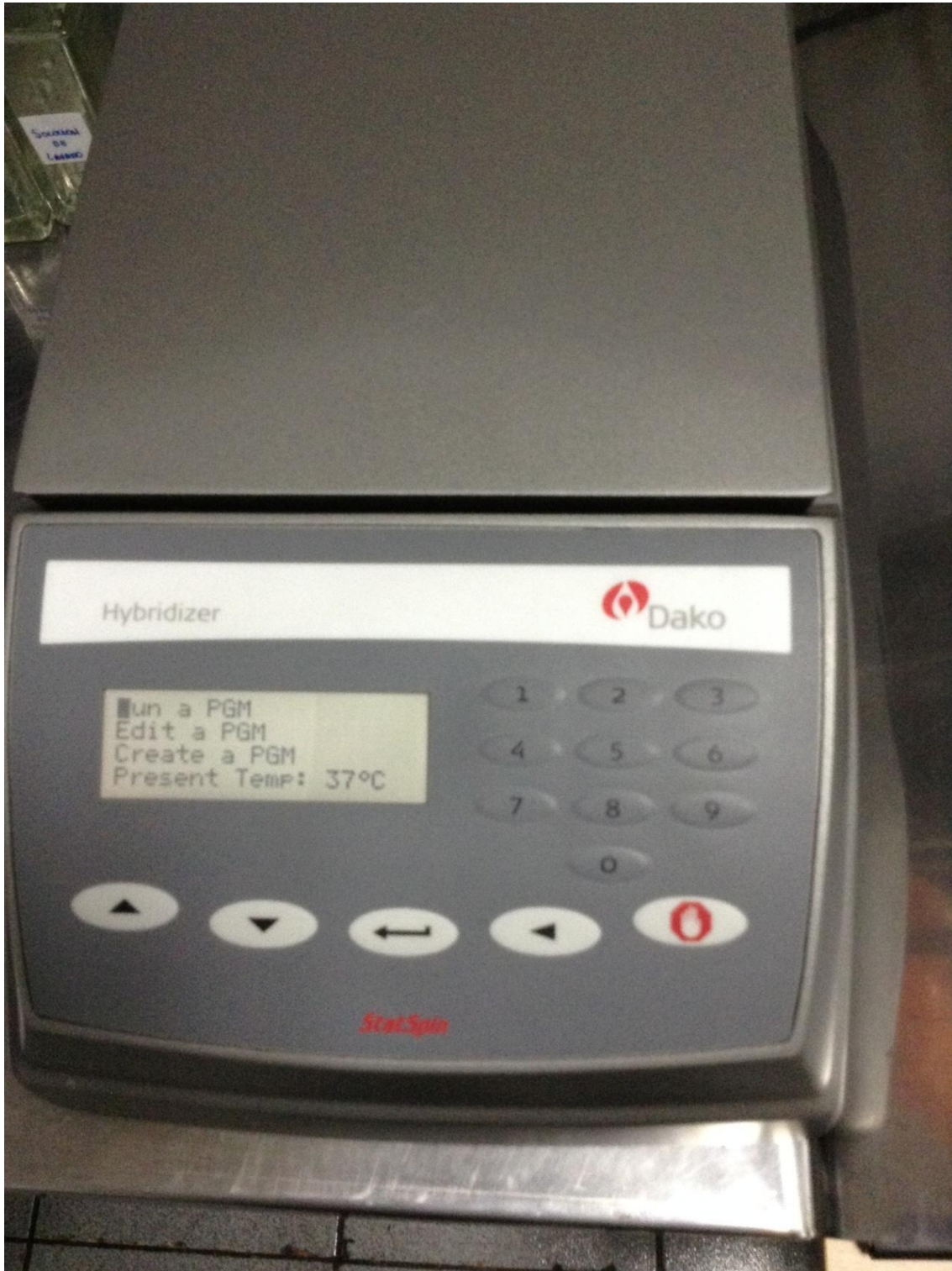
|                      |                              |                                   |                                   |                        |          |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------|
| FECHA:               | BLOQUE RECEPTOR              | COMPLETO <input type="checkbox"/> | DIVIDIDO <input type="checkbox"/> | ID BLOQUE RECEPTOR     |          |
| DIÁMETRO DE POCILLO: | 3mm <input type="checkbox"/> | 2m <input type="checkbox"/>       | 1m <input type="checkbox"/>       | Nro. PUNCH POR MUESTRA | OPERADOR |

Micro arreglos de los bloques con cáncer de pulmón obtenidos por el equipo Automated Tissue Microarrayer con hoja de ubicación de arreglo.

### 11.3 EQUIPOS PARA REALIZACION DE LA TECNICA DE FISH



Olla de presión para incubación de DAKO del Hospital Carlos Andrade Marín



Hibridador de DAKO del Hospital Carlos Andrade Marín para al realizar la hibridación de la sonda del EGFR para el FISH

## 11.4 REPORTE DE RESULTADOS DE LA TECNICA

HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARIN  
SERVISIO DE PATOLOGIA  
PATOLOGIA MOLECULAR

### REPORTE EGFR FISH

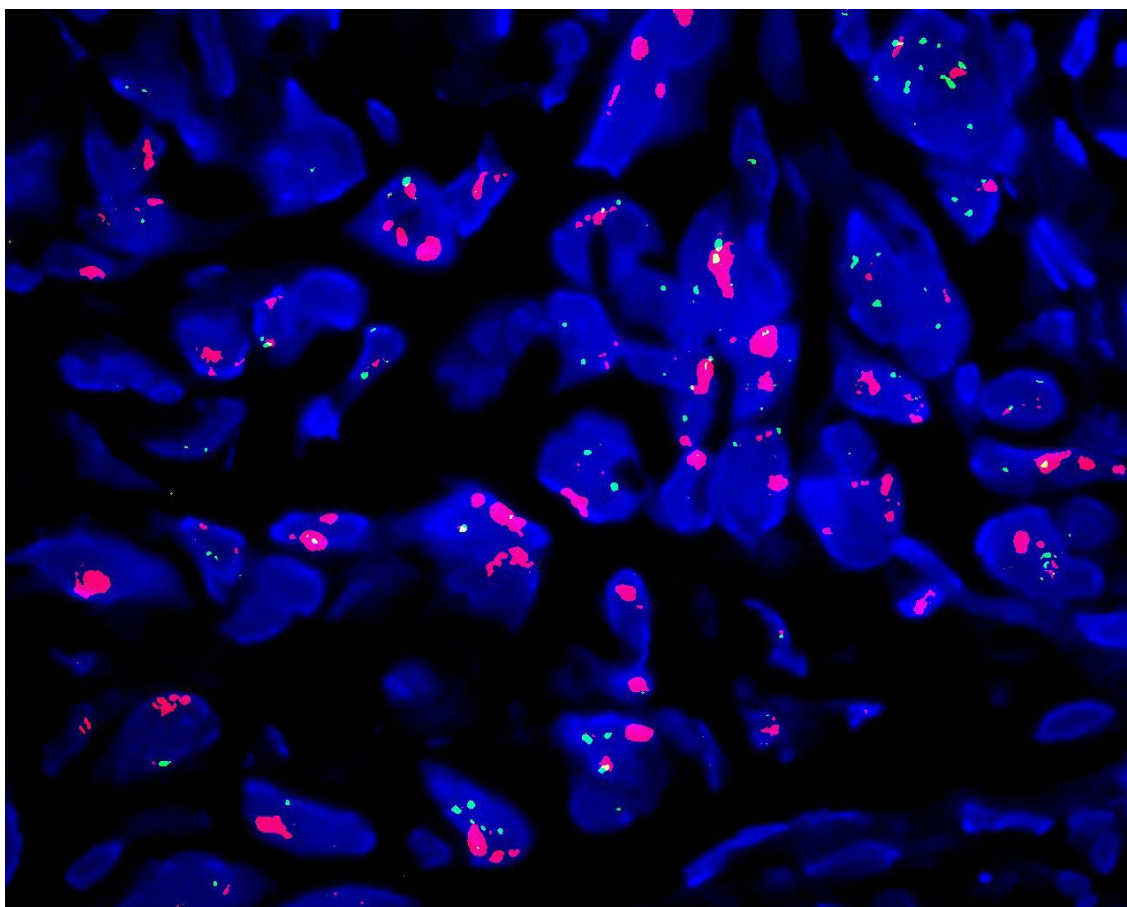
|                    |                  |
|--------------------|------------------|
| NOMBRE:            |                  |
| FECHA DEL ESTUDIO: | HISTOPATOLOGICO: |
| CI:                | FOTO:            |
| EDAD:              |                  |

| RECUESTO DE SEÑALES EN 20 NUCLEOS |      |                                     |                   |      |        |
|-----------------------------------|------|-------------------------------------|-------------------|------|--------|
| NUMERO                            | EGFR | CEN-17                              | NUMERO            | EGFR | CEN-17 |
| 1                                 |      |                                     | 11                |      |        |
| 2                                 |      |                                     | 12                |      |        |
| 3                                 |      |                                     | 13                |      |        |
| 4                                 |      |                                     | 14                |      |        |
| 5                                 |      |                                     | 15                |      |        |
| 6                                 |      |                                     | 16                |      |        |
| 7                                 |      |                                     | 17                |      |        |
| 8                                 |      |                                     | 18                |      |        |
| 9                                 |      |                                     | 19                |      |        |
| 10                                |      |                                     | 20                |      |        |
| TOTAL                             |      |                                     | TOTAL             |      |        |
| TOTAL 1-20                        |      |                                     | RADIO EGFR/CEN-17 |      |        |
|                                   |      | RADIO 2+ SE OBSERVA AMPLIFICACION   |                   |      |        |
|                                   |      | RADIO2- NO SE OBSERVA AMPLIFICACION |                   |      |        |
|                                   |      | TEJIDO NO APTO PARA EL ESTUDIO      |                   |      |        |
| PATOLOGO                          |      |                                     |                   |      |        |

---

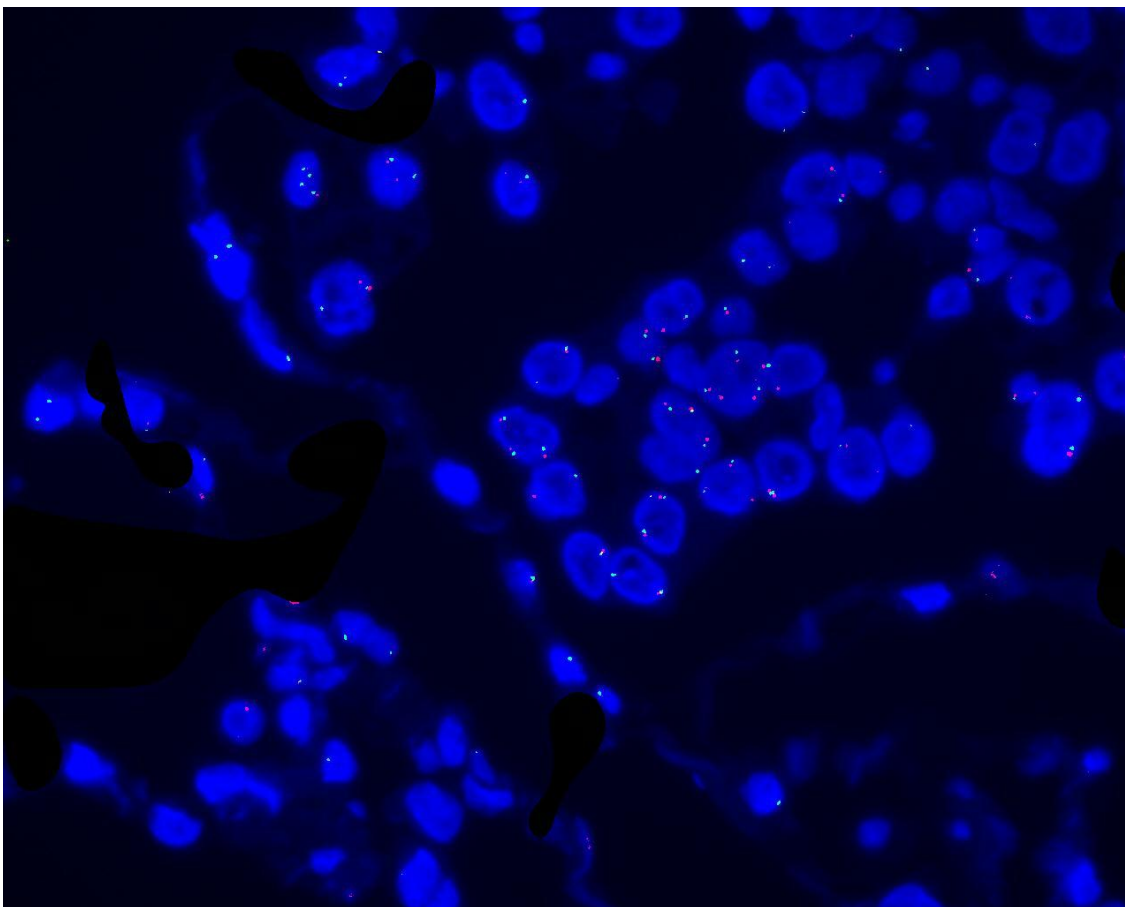
Reporte utilizado para la lectura del FISH

## 11.5 RESULTADOS POSITIVOS DE LA TECNICA



Resultado positivo de sobreexpresión de EGFR mediante la técnica de FISH realizada en el Hospital Carlos Andrade Marín

## 11.6 RESULTADOS NEGATIVOS DE LA TECNICA



Resultado negativo de Sobreexpresión de EGFR mediante la de FISH realizada en el Hospital Carlos Andrade Marín

## 11.7 INSERTO DE LA TECNICA



### EGFR/CEN-7 FISH Probe Mix Code No. Y5500

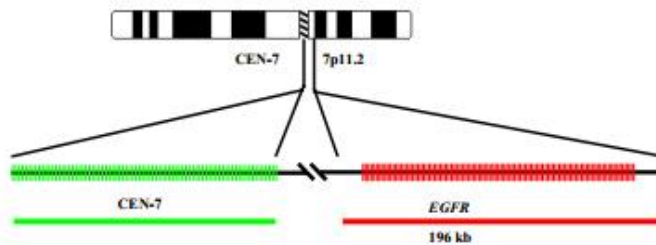
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

#### Recommended use

EGFR/CEN-7 FISH Probe Mix is recommended for gene copy number detection of the EGFR gene located on chromosome 7p11.2 and for copy number detection of the chromosome 7 centromere region (chromosome 7 copy number detection). When the probe mix is used on histology specimens the DakoCytomation Histology FISH Accessory Kit, code No. K5599, is recommended. When the probe mix is used on cytology specimens the DakoCytomation Cytology FISH Accessory Kit, code No. K5499, is recommended. Both kits contain all key reagents, except for the probe, necessary to perform 20 FISH assays.

#### Introduction

The EGFR/CEN-7 FISH Probe Mix detects the copy number of the EGFR gene located on chromosome 7p11.2 using the chromosome 7 centromere region as a reference (chromosome 7 copy number detection). The EGFR gene encodes the epidermal growth factor receptor (EGFR; erbB-1), a transmembrane glycoprotein of the erbB family of tyrosine kinase receptor proteins. The erbB family includes erbB-2 (HER2/neu), erbB-3 and erbB-4. EGFR is a receptor for EGF, but also for other members of the EGF family, such as transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), amphiregulin, betacellulin, heparin-binding EGF-like growth factor, GP30 and vaccinia virus growth factor. EGFR is involved in the control of cell growth, differentiation and angiogenesis. The EGFR gene is located on chromosome 7p11.2 (1) but was formerly reported to 7p12. The EGFR gene spans approximately 188 kb and contains 28 exons encoding a 170 kDa protein (1). The EGFR gene is present in 2 copies in all normal diploid cells. The 7p11 region is amplified in various cancers as reported by Comparative Genomic Hybridization (CGH) (2, 3). The copy number of EGFR can be determined by direct fluorescence in situ hybridization (FISH) (4-6).



#### Target (red)

The Texas Red-labeled DNA probe (EGFR) binds to a 196 kb segment containing the EGFR gene on chromosome 7q11.2.

#### Target (green)

The fluorescein-labeled PNA probe (CEN-7) binds to the centromeric region of chromosome 7.

#### Reagent provided

The ready-to-use FISH Probe Mix is based on a combination of PNA (peptide nucleic acid) (7) and DNA technology. This Probe Mix consists of a 196 kb Texas Red-labeled DNA probe covering the full EGFR region, and a mixture of fluorescein-labeled PNA probes targeted at the centromeric region of chromosome 7. The specific hybridization to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each EGFR gene and a distinct green fluorescent signal at each centromeric region of chromosome 7. To diminish background staining, the Probe Mix also contains unlabeled PNA oligos directed towards repetitive sequences. The reagent is provided in liquid form in hybridization solution containing 45% formamide, 10% dextran sulphate, 0.21% N-methyl-2-pyrrolidone, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate, and blocking agent. The vial contains 200 $\mu$ l corresponding to 20 tests (10 $\mu$ l per test)

#### Precautions

1. The device is not intended for clinical use including diagnosis, prognosis, and monitoring of a disease state, and it must not be used in conjunction with patient records or treatment.

2. The reagent contains 45% formamide and is labeled:

Toxic.

R61 May cause harm to the unborn child.

S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).

S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.

S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.

As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper working procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.

(113618-001)

Y5500/RJQ/SVM/16.08.05 p. 1/2

DakoCytomation Denmark A/S Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17









**Storage**

Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact DakoCytomation Technical Support.

**References**

1. Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sindair CS, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 2001;71:1-20.
2. Stocks SC, Pratt N, Sales M, Johnston DA, Thompson AM, Carey FA, et al. Chromosomal imbalances in gastric and esophageal adenocarcinoma: specific comparative genomic hybridization-detected abnormalities segregate with junctional adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:50-8.
3. Varis A, Puolakkainen P, Savolainen H, Kokkola A, Salo J, Nieminen O, et al. DNA copy number profiling in esophageal Barrett adenocarcinoma: comparison with gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127:53-8.
4. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21:3798-807.
5. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Barlotini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-55.
6. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005;6:279-86.
7. Nielsen PE, Egholm M, editors. *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*. Norfolk NR18 0EH, England: Horizon Scientific Press; 1999.

**Explanation of symbols**

|   |                              |  |   |   |              |
|---|------------------------------|--|---|---|--------------|
|  REF | Catalogue number             |   | Keep away from sunlight (consult storage section) |  | Manufacturer |
|      | Consult instructions for use |   | Batch code  |  | Toxic        |
|     | Temperature limitation       |  | Use by  |   |              |

(113618-001)

Y5500/RUO/SVM/16.08.05 p. 2/2

DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17

Inserto del kit de DAKO para EGFR/CEN7 FISH para sobreexpresión de EGFR.