

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DETECCION DE MUTACIONES EN EL  
ONCOGEN K - ras EN NEOPLASIAS EPITELIALES  
COLORRECTALES

POR

Q.C.B. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Noviembre, 1998



TM

RC268

.44

.R37

M3

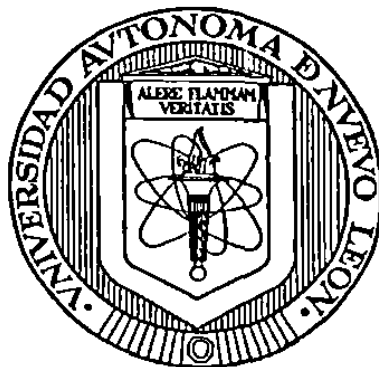
c.1



1080082468

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL ONCOGEN K - ras  
EN NEOPLASIAS EPITELIALES COLORRECTALES**

Por

**Q.C.B. SANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ GARZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Noviembre, 1998

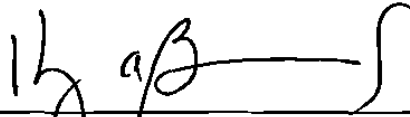
. d 8



(82468)

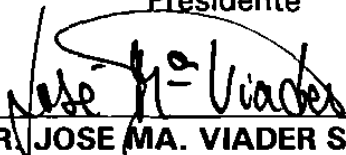
**"DETECCION DE MUTACIONES EN EL ONCOGEN K-ras EN NEOPLASIAS  
EPITELIALES COLORRECTALES"**

**Aprobación de la Tesis:**



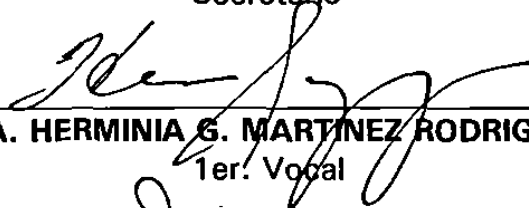
---

**DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA**  
Presidente



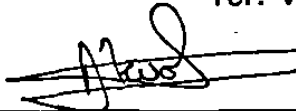
---

**DR. JOSE MA. VIADER SALVADO**  
Secretario



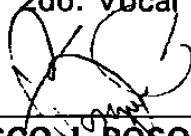
---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ**  
1er. Vocal



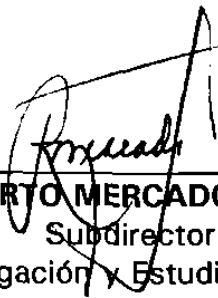
---

**DRA. AGÑES REVOL DE MENDOZA**  
2do. Vocal



---

**DR. FRANCISCO J. BOSQUES PADILLA**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
De Investigación y Estudios de Posgrado

*El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la co-asesoría del Dr. José Ma. Viader Salvadó.*

## **DEDICATORIA**

**A Dios** por ser mi creer, y la luz que ilumina mi vida.

A mis padres (**Eloisa y Joel**) por sus consejos que han sido mi guía durante todos estos años y por la confianza que siempre me han dado, la cual me ha ayudado a crecer día a día

A **Gordo** quien ha sido un gran amigo y compañero desde siempre, y aunque nos enojemos, sabemos que siempre estaremos unidos.



## AGRADECIMIENTOS

A todos los pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales que contribuyeron para el desarrollo de esta tesis.

A las personas que de una u otra manera colaboraron para hacer posible la realización de esta tesis; en orden alfabético:

Dr. Francisco J. Bosques Padilla  
Dra. Ana Laura Calderon Garcidueñas  
Dr. José Alberto González González  
Dr. Jorge González Maldonado  
Dr. Héctor J. Maldonado Garza  
Dr. Alberto Nidderhauser García  
Dr Alfonso de J. Núñez Salazar.  
Dr. Genaro A. Ramírez Correa  
Q.C.B. Celia Nohemi Sánchez Domínguez  
Dra. Maricela Zarate Gómez

A todos los integrantes de los Servicios de Gastroenterología, Cirugía y Anatomía Patológica del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y del Hospital de Especialidades No. 25 del Centro Médico del noreste Siglo XXI del IMSS.

A todos mis "Amigos" que de una u otra forma me apoyaron cuando los necesite. Gracias por soportarme.

A Mr. Chandler por confiar en mi durante todos estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto y por la beca que me otorgó.

## RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Q.C.B. Sandra Guadalupe. Martínez Garza

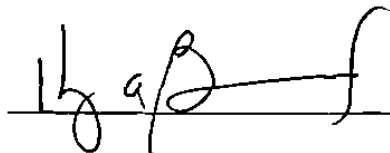
Título del Estudio: **DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL ONCOGEN K-ras EN NEOPLASIAS EPITELIALES COLORRECTALES.**

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en *Biología Molecular e Ingeniería Genética.*

Área de Estudio: **Medicina Molecular.**

**Objetivo y Método de Estudio:** El CCR es la segunda o tercera causa más común de muerte en los países occidentales y su incidencia va en aumento. Durante 1996 se esperaba diagnosticar 133,500 nuevos casos de CCR y la muerte de 55,000 personas por la misma causa, tan sólo en E.U.A. El oncogen K-ras es uno de los genes alterados tempranamente durante la patogénesis del CCR por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-ras en pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales. La investigación incluyó un aspecto de tipo clínico y uno experimental. En el primero se obtuvo la información clínico-patológica de una muestra de 101 pacientes mediante trabajo de campo, entrevista con los pacientes y aplicación de un cuestionario. La parte experimental incluyó: 1) la formación de un banco de DNA a partir de muestras de tejido fresco y embebido en parafina, 2) la implementación la técnica de PCR y cortes con enzimas de restricción diagnósticas para la detección de las mutaciones presentes en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras, 3) la determinación de la frecuencia de mutaciones en nuestra población, 4) la correlación de los datos clínico-patológicos con la presencia de mutaciones. **Contribuciones y Conclusiones:** El método diagnóstico basado en la PCR y cortes con enzimas de restricción permitió detectar la presencia de mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-ras, e identificar casi la totalidad de éstas. Las otras fueron detectadas por secuenciación. La frecuencia de mutaciones en estos codones (37.6%) es semejante a la reportada para otras poblaciones. En este estudio se observó que la frecuencia de mutaciones es mucho mayor en adenomas que en adenocarcinomas y se observó que la frecuencia de mutaciones es mucho mayor en los adenomas vellosos que en los mixtos y tubulares, existiendo diferencia significativa en ambos casos. No se observó diferencia significativa en la frecuencia de las mutaciones y la edad de los pacientes o localización del tumor o grado de invasión de los adenocarcinomas. Al conocer el perfil de mutaciones en nuestra población y ya que existen reportes de detección de mutaciones en el oncogen K-ras en muestras de heces, podría utilizarse este método como una prueba de detección oportuna no invasiva.

FIRMA DEL ASESOR:



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Frecuencia de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-ras.	8
2. Condiciones de reacción para las PCRs.	21
3. Condiciones del programa del termociclador para las PCRs.	21
4. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen K-ras.	22
5. Detección de mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras.	23
6. Reactivos utilizados en la preparación de los geles de poliacrilamida al 12%.	24
7. Distribución por edades de los pacientes.	26
8. Subclasificación de los Adenomas y Adenocarcinomas.	27
9. Cambios aminoacídicos encontrados.	34
10. Mutaciones encontradas por grupos de edades.	34
11. Mutaciones encontradas según la localización anatómica de las neoplasias.	35
12. Mutaciones encontradas en adenomas - vs - AdCa.	35
13. Mutaciones encontradas en adenomas según su histología.	36
14. Mutaciones encontradas en los adenocarcinomas según su grado de diferenciación.	36
15. Mutaciones encontradas en adenocarcinomas según la clasificación de Duke.	37

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Modelo de evolución del CCR.	3
2. Familia Ras.	5
3. Función de la proteína Ras.	6
4. Estrategia experimental.	13
5. Esquema que representa dos Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	17
6. Detección de la mutación en el codón 12 que cambia glicina a serina.	18
7. Estrategia para detectar si el codón 12 del proto-oncogen K-ras está mutado.	19
8. Estrategia general.	20
9. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 2%	28
10. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras.	29
11. Detección de las mutaciones de serina y aspártico en el codón 12.	30
12. Detección de la mutación de cisteína en el codón 12.	31
13. Detección de las mutaciones de valina y alanina en el codón 12.	32



## NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
%	Por ciento
a.a.	Aminoácidos
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CCR	Cáncer Colorrectal
cols.	Colaboradores
DCC	Deletado en Cáncer Colorrectal
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de Desoxinucleósidos
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
E.U.A..	Estados Unidos de América
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar
g	Gramos
hrs.	Horas
M	Concentración Molar
MASA	Amplificación mutagénica alelo específica
mg	Miligramos
min.	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración Micromolar
MUT.	Mutación
ng	Nanogramos
p	Significancia estadística
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log [H^+]$
RR	Riesgo relativo
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la concentración

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 CÁNCER: un grave problema de salud.	1
1.2 GENÉTICA Y CÁNCER: el cáncer colorrectal como modelo.	2
1.3 ALTERACIONES GÉNICAS ENCONTRADAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL	3
1.4 LA FAMILIA RAS Y ONCOGÉNESIS.	5
1.5 TIPO DE MUTACIONES PRESENTES EN EL ONCOGEN K-ras.	7
1.6 OBJETIVOS.	9
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
2.1 MATERIALES.	11
2.1.1 Criterios de inclusión.	11
2.1.2 Muestras de tejido fresco.	11
2.1.3 Muestras de tejido fresco embebido en parafina.	12
2.2 MÉTODOS.	12
2.2.1 Implementación de las técnicas de extracción de DNA.	14
2.2.1.A Extracción de DNA de tejido fresco.	14
2.2.1.B Extracción de DNA de tejido embebido en parafina.	15
2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.	16
2.2.3 Implementación de la técnica de PCR y cortes con enzimas restricción diagnósticas.	17
2.2.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.	17
2.2.3.2 Rastreo de mutaciones por cortes con enzimas de restricción.	21
2.2.3.2.A Detección de mutaciones en el codón 12.	22
2.2.3.2.B Detección de mutaciones en el codón 13.	23
2.2.3.3 Visualización de los fragmentos de restricción.	24
2.2.4 Secuenciación de las muestras no detectadas.	24

2.2.4.1 Preparación de la muestra.	25
2.2.4.2 Secuenciación nucleotídica.	25
2.2.5 Análisis estadístico.	25

### **3. RESULTADOS** 26

#### **3.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.** 26

#### **3.2. DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR.** 26

##### **3.2.1 Banco de DNA genómico.** 27

##### **3.2.2 PCR + cortes con enzimas de restricción diagnóstica.** 28

##### **3.2.3 Diagnóstico por Secuenciación.** 33

##### **3.2.4 Mutaciones encontradas.** 33

##### **3.3.1 Relación entre características de los tumores y la presencia de mutaciones.** 34

### **4. DISCUSIÓN.** 38

### **5. CONCLUSIONES.** 41

### **6. PERSPECTIVAS.** 42

#### **• REFERENCIAS.**

#### **• ANEXO.**

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 CÁNCER: un grave problema de salud.**

Los treinta mil millones de células de un organismo normal y saludable viven en un complejo condominio interdependiente, regulando cada una su proliferación. Las células se reproducen sólo cuando reciben instrucciones para hacerlo y al unísono con sus células vecinas. Tal coordinación asegura que cada tejido mantenga su tamaño y su arquitectura apropiada según las necesidades del organismo (1). Cuando esta colaboración se rompe, se produce un cáncer o neoplasia, caracterizado por una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede al tejido normal y que no está coordinado con él, persistiendo de la misma forma excesiva, aun tras finalizar el estímulo que suscitó la alteración (2).

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en México y E.U.A., después de las enfermedades cardiovasculares. El cáncer afecta a individuos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. La frecuencia de muchos de los cánceres aumenta con la edad, de modo que conforme el promedio de vida de los seres humanos se incrementa, un número mayor desarrollará la enfermedad. Aparte del sufrimiento humano, la carga económica para la sociedad es inmensa (1).

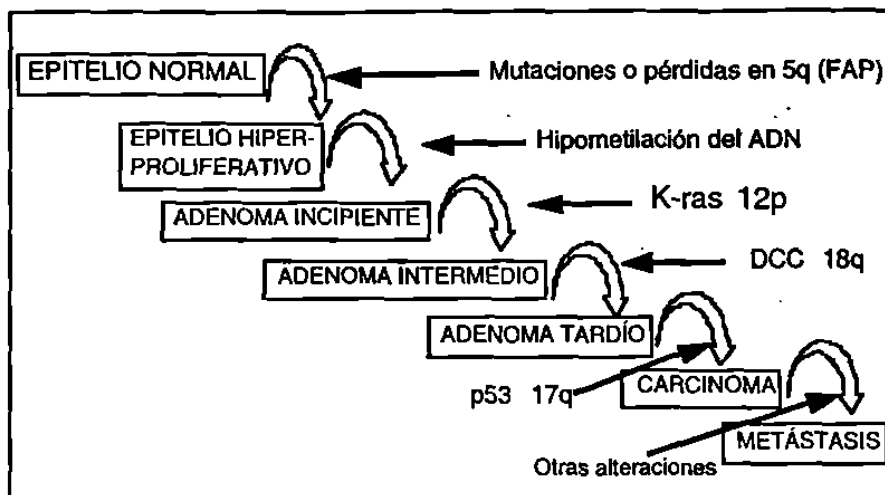


## 1.2 GENÉTICA Y CANCER: el cáncer colorrectal como modelo.

Se piensa que el cáncer es la consecuencia de una serie de alteraciones genéticas que *progresivamente interrumpen el mecanismo normal que controla la proliferación celular*. Este modelo ha sido mejor ejemplificado por el cáncer colorrectal (CCR). De acuerdo al mismo, el CCR evoluciona a través de una serie de formas *histopatológicas, comenzando con áreas displásicas del epitelio del colon, pasando a través de un estado de pólipos adenomatosos, y finalmente progresando a un carcinoma franco* (3, Fig. 1). Los pacientes con la enfermedad avanzada tienen un pobre pronóstico. Sin embargo, los tumores diagnosticados en un estadio temprano pueden ser curados por escisión colonoscópica o quirúrgica (5).

Las técnicas de clonación de genes han permitido a los investigadores identificar, aislar y estudiar en detalle una serie de proto-oncogenes que, en forma mutante (oncogenes) imparten un carácter maligno a las células. Los *proto-oncogenes son genes que al igual que todos los genes de la clase II (que codifican para proteínas) del genoma humano, están compuestos de una región regulatoria y una estructural. La primera modula la transcripción de la segunda en respuesta a un estímulo, mientras que la segunda codifica la secuencia aminoacídica para la proteína en cuestión*. Estos genes están implicados en el control de la multiplicación y cambios en su región promotora y estructural pueden activar el proto-oncogen convirtiéndolo en oncogen (4).

Los diversos cambios genéticos que activan los oncogenes, incluyendo las mutaciones puntuales y los rearrreglos cromosómicos a gran escala, son detectables en los genomas de las células tumorales, pero no en los genomas de las células de tejido normal adyacente. Es aparente que estas lesiones genéticas se derivan de una célula dentro del tejido blanco, la cual se convierte en el ancestro de la población total del tumor completo. Dichas mutaciones somáticas no tienen efecto en las células germinales y no son transmitidas genéticamente a la progenie del organismo afectado (4).



**Figura 1. Modelo de evolución del CCR.** Se ilustran los diferentes eventos mutagénicos que pueden participar en la generación del Cáncer Colorrectal. Modificado a partir de Vogelstein (14).

Trabajos más recientes han revelado la existencia de otra clase de genes, denominados genes supresores de tumores (inicialmente conocidos como antioncogenes), los cuales juegan una función igualmente importante en la patogénesis del cáncer humano (4). A los genes supresores de tumores se les llama genes guardianes del organismo, ya que su tarea es mantener el ciclo y el crecimiento celular de una forma adecuada, función que se pierde al mutarse ambos alelos (2).

### 1.3 ALTERACIONES GÉNICAS ENCONTRADAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

En 1988, Vogelstein y cols. (14) estudiaron la participación de las cuatro alteraciones génicas encontradas en los cánceres colorrectales:

mutaciones en el gen RAS y deleciones en los cromosomas 5, 17 y 18, determinando su ocurrencia con respecto a diferentes estados de la tumorigénesis colorrectal. Encontraron frecuentemente mutaciones del gen ras en adenomas, siendo ésta la primera demostración de su presencia en tumores humanos benignos.

En adenomas mayores de 1 cm en tamaño, la prevalencia fue similar a la observada en carcinomas (58% y 47%, respectivamente). Las secuencias en el cromosoma 5 que están ligadas a poliposis adenomatosa familiar rara vez estuvieron ausentes en adenomas de dichos pacientes. Las secuencias del cromosoma 18 se perdieron frecuentemente en carcinomas de colon (73%). Estos resultados sugieren un modelo donde los pasos requeridos para la malignidad involucran la activación del oncogen a la par con la pérdida de diversos genes que normalmente suprimen la tumorigénesis (Figura 1).

Delattre y cols. (16) en 1989 revisaron los tres tipos generales de alteraciones genéticas en cáncer colorrectal: 1) cambios en el contenido de DNA de las células malignas detectables por citometría de flujo, 2) pérdida de material genético (pérdida completa del cromosoma 18, rearreglo estructural del brazo corto del cromosoma 17 y pérdida parcial de 5q, como se demuestra por pérdida de heterocigocidad, y 3) y mutaciones puntuales de los oncogenes Ras. Ellos encontraron que en casi el 40% de los tumores hubo activación del gen ras (principalmente K-ras) y que ésta se debía a cambios en los codones 12 y 13.

En 1990, Fearon y Vogelstein (17) revisaron las evidencias que apoyan su modelo genético en etapas para la tumorigénesis colorrectal. Sugirieron que mutaciones múltiples conducen a la progresión del epitelio normal a carcinoma metastásico a través de epitelio hiperplásico→adenoma temprano→adenoma intermedio→adenoma tardío→carcinoma. Los genes blanco para estas mutaciones incluyen APC (Adenomatous polyposis coli) en el cromosoma 5, K-ras en el cromosoma 12, p53 en 17p, y DCC (Deleted in colorrectal carcinoma) en el cromosoma 18 (Figura 1).

#### 1.4 LA FAMILIA RAS Y ONCOGENESIS.

Los proto-oncogenes Ras integran una familia génica de 3 miembros, los cuales se encuentran dispersos en el genoma. Las estructuras de cada uno de los genes están muy relacionadas entre si, como se ilustra en la figura 2 y aunque son miembros de la misma familia los genes H, K y N-ras han evolucionado por separado. Los genes H y K-ras tienen sus contrapartes v-ras en los virus del Sarcoma murino de Harvey y Kirsten respectivamente. Los genes v-ras están muy relacionados con sus correspondientes genes c-ras, existiendo sólo diferencia de 3 ó 7 a.a., lo que implica que los virus Harvey y Kirsten se originaron por eventos de recombinación independiente.

Aunque los genes ras: H-ras, N-ras y K-ras tienen estructuras genéticas diferentes, todos codifican para proteínas de 189 aminoácidos (a.a.), genéricamente designados como p21 por su peso molecular (21 kilodaltons).

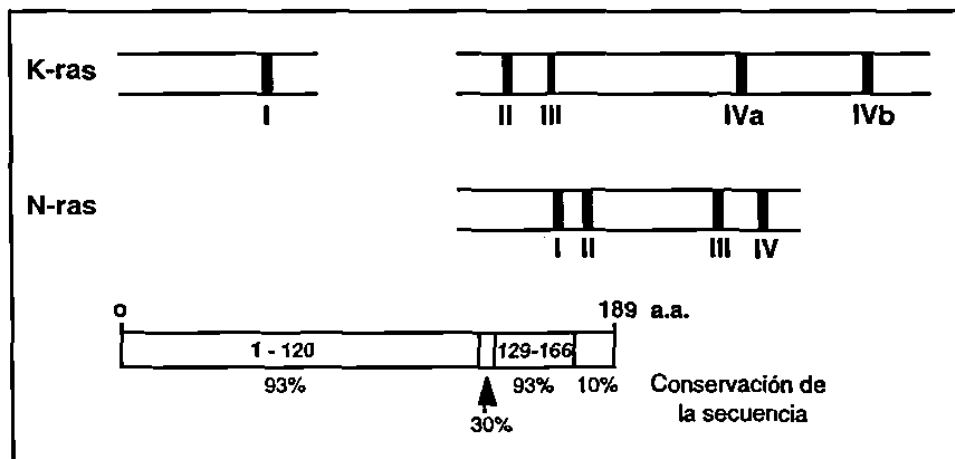
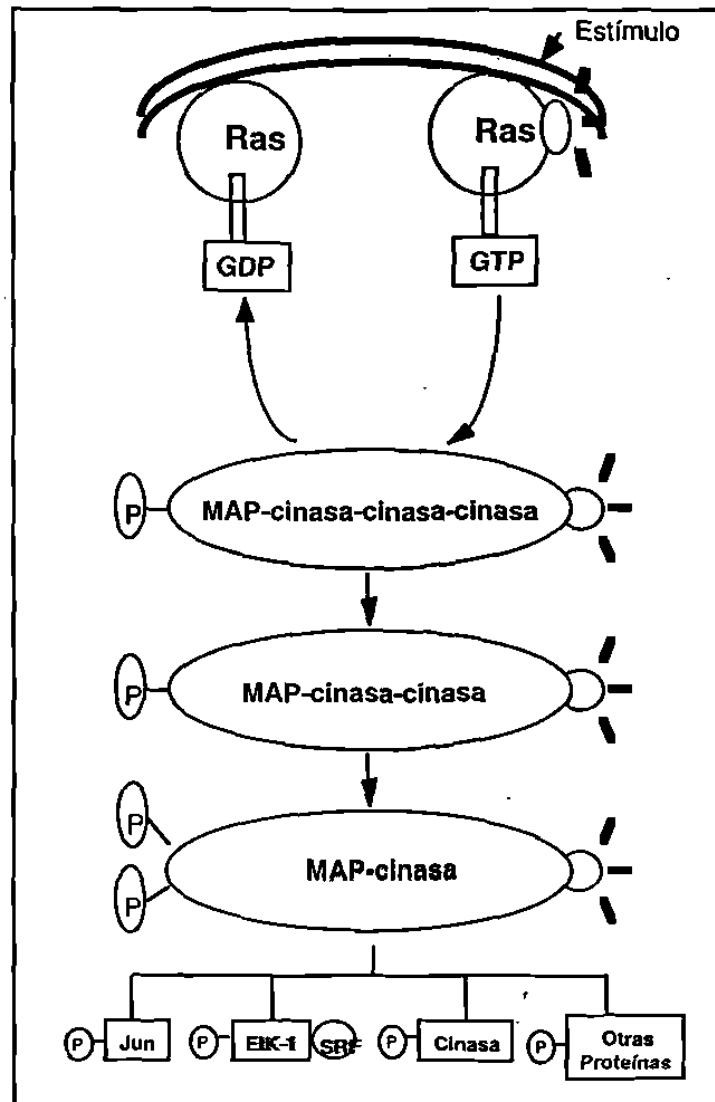


Figura 2. Los genes H y N-ras tienen 3 exones homólogos y el gen K-ras tiene un exón adicional, el cual le confiere la característica de codificar para proteínas diferentes.

La proteína ras normal actúa en la célula como un elemento transductor de señal, como intermediario de una cascada, recibe señales estimuladoras del crecimiento, frecuentemente liberadas por receptores mitógenos de la superficie celular, y las pasa hacia las moléculas blanco que a su vez



estiman la proliferación celular. Una vez que recibe la señal estimuladora, la proteína ras une GTP y entra a su conformación activa emisora de señal. Sin embargo permanece activa sólo brevemente, liberando sólo un pulso de señal estimuladora del crecimiento, y rápidamente regresa a su estado inactivo por hidrólisis de su GTP. Esta proteína parecería actuar como un regulador, apagando y encendiendo otra proteína que puede implementar las señales estimuladoras del crecimiento en la célula (4, Figura 3).



**Figura 3. Función de la proteína Ras.** Después de recibir estímulo por parte de un receptor que se ha unido a su factor de crecimiento correspondiente, la proteína RAS une GTP y se activa transitoriamente para transmitir señales estimuladoras de la proliferación celular mediante una cascada de quinasas.

La ruta favorecida para la activación de los oncogenes ras es una mutación puntual. Un solo nucleótido en el gen es alterado por exposición a radiación o a carcinógenos químicos, lo cual resulta en un cambio de un aminoácido en la proteína codificada (4). Estos genes adquieren propiedades *malignas debido a estas mutaciones puntuales que afectan principalmente los* a.a. 12, 13 o 61 de su respectiva proteína. K-ras está mucho más involucrado en malignidad que H-ras, mientras que N-ras rara vez lo está.

La forma oncogénica de la proteína p21 ras está atrapada en un estado activo, inundando la célula con señales estimuladoras del crecimiento. Estas proteínas oncogénicas son capaces de liberar las señales aún en ausencia de estimulación de un receptor unido a su factor de crecimiento respectivo. La determinación de la estructura tridimensional de la proteína ras ha revelado que los residuos de aminoácidos (posiciones 12, 13 y 61) que están afectados por las mutaciones oncogénicas están directamente involucrados en la unión e hidrólisis de GTP. Alteraciones en estos residuos comprometen la habilidad de la proteína codificada por el gen ras para hidrolizar el GTP a GDP (9).

### 1.5 TIPOS DE MUTACIONES PRESENTES EN EL ONCOGEN K-ras.

Se han detectado genes ras mutados en varios tipos de tumores, aunque con diferentes frecuencias. Se ven frecuentemente en carcinomas humanos de páncreas, pulmón, colon, mama, tiroides, así como en ciertos tipos de leucemias(8, 19, 28).

Se ha demostrado que las mutaciones en el gen ras ocurren en alrededor de un tercio de los cánceres colorrectales, presentándose una alta incidencia del gen K-ras con mutaciones en el codón 12 (12, 13, 14, 15). No se encontró una correlación aparente entre la presencia de oncogenes mutantes y el grado de invasividad del tumor, pero se obtuvo evidencia de la activación mutacional en tejido premaligno (13).

En los estudios en los cuales se analizaron adenomas colorrectales la frecuencia de mutaciones en el gen K-ras es variable desde un 31% (21) hasta un 68% (14) aunque el codón 12 permanece siendo el más afectado, pensándose que esta diferencia es debido al tipo de adenomas utilizados, en lo que si están de acuerdo es que el codón principalmente mutado es el 12 (21).

En pacientes con tumores colorrectales que contenían mutaciones de K-ras, se pudieron detectar las mutaciones en DNA purificado de heces (10, 18).

Basándonos en los resultados descritos por Vogelstein y cols. (14) en 1988, la tabla 1 aporta el tipo y las frecuencias por codones de las mutaciones encontradas en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras.

**Tabla 1. Frecuencia de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-ras.**

CODÓN	MUT.	ADENOMA	%	CARCINOMA	%
12	Asp	8	34.8	11	29.7
12	Ser	2	8.7	5	13.5
12	Cys	1	4.3	6	16.2
12	Ala	2	8.7	2	5.4
12	Val	4	17.4	6	16.2
13	Asp	6	26.1	7	18.9

Sin duda, la activación del proto-oncogen K-ras juega un papel clave en la patogenia del CCR. Y debido a que en nuestra población no se conoce el tipo y frecuencia de mutaciones presentes en los tumores colorrectales nos propusimos este trabajo. Esta información se considera un *prerequisito* tanto para conocer el papel de K-ras en CCR de la región, como para planear estrategias para la detección oportuna de sus mutaciones.

## 1.6 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

- ◆ Determinar la frecuencia de las mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras en pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ◆ Implementar la técnica de extracción de DNA genómico a partir de tejidos frescos, para establecer un banco de DNA recuperado de las muestras provenientes de los pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales. Este banco nos permitirá estudiar las mutaciones del oncogen K-ras en el presente trabajo y otros genes en los que le sucedan.
- ◆ Implementar la técnica de PCR y cortes con enzimas de restricción diagnósticas descrita por Kumar R. y cols. y modificada por Shibata D. y cols. (23), para detección de las mutaciones presentes los codones 12 y 13 del oncogen K-ras.
- ◆ Secuenciar las muestras positivas para mutaciones en el codón 12 o 13, que no sean detectables con la técnica seleccionada.

- ◆ **Determinar las frecuencias de las mutaciones del oncogen K-ras en nuestra población, y compararlas con las reportadas en otras poblaciones.**
  
- ◆ **Correlacionar las características de las neoplasias y la presencia de mutaciones.**
  
- ◆ **Realizar un estudio paralelo con muestras fijadas en parafina, a fin de reforzar el análisis epidemiológico molecular.**

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 MATERIALES.**

##### **2.1.1 Criterios de inclusión.**

Se estableció que todas las muestras a incluirse en el presente estudio debían ser neoplasias epiteliales colorrectales con un diagnóstico anatomopatológico confirmatorio, obtenidas mediante colonoscopia o cirugía abierta.

##### **2.1.2 Muestras de tejido fresco.**

Las muestras de tumores frescos se recolectaron con la valiosa ayuda de los Servicios de Gastroenterología y Cirugía General del Hospital Universitario "Dr. J. Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., así como del Hospital de Especialidades No. 25 del Centro Médico del Noreste Siglo XXI del IMSS.

Las biopsias de tumores y de pólipos fueron colocadas en tubos eppendorf de 2 ml utilizando guantes y pinzas estériles y se transportaron en

hielo hasta llegar al laboratorio en donde se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. En las muestras de tumores obtenidas por cirugía se recolectaron muestras tanto de tumor, así como de tejido de transición (entre tejido tumoral y normal) y tejido normal.

### **2.1.3 Muestras de tejido embebido en parafina.**

A fin de reforzar el análisis epidemiológico molecular, se realizó una búsqueda en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "Dr. J. Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y del Hospital de Especialidades No. 25 del Centro Médico del Noreste Siglo XXI del IMSS, sobre los casos de pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales. Así se recuperaron 50 laminillas y los expedientes clínicos correspondientes para poder contestar a las preguntas del cuestionario.

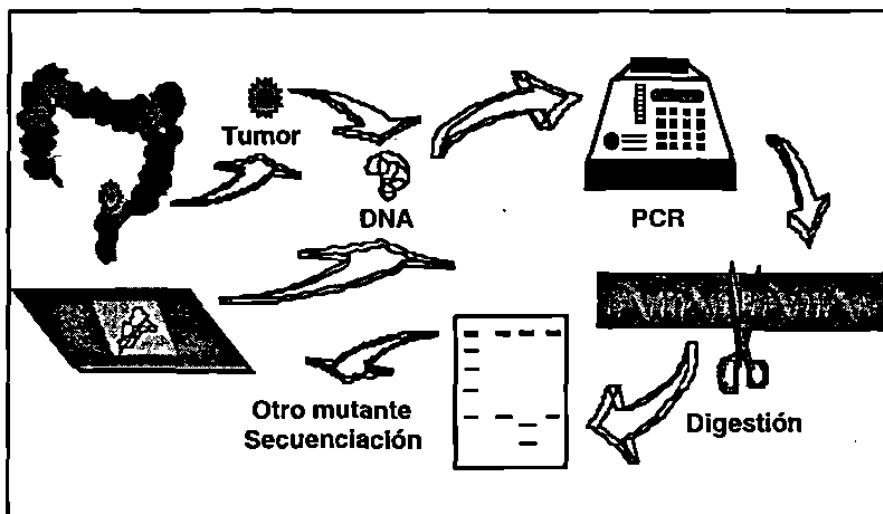
## **2.2 MÉTODOS.**

La investigación constó de dos aspectos: uno de tipo clínico y el otro experimental. En la investigación clínica, se diseñó un cuestionario que incluía datos clínico-patológicos (ver anexo 1). El trabajo de campo consistió en entrevistas personalizadas con cada paciente, durante las cuales se aplicó el cuestionario referido y se les informó del estudio. Los datos clínicos nos permitieron relacionarlos con los datos moleculares obtenidos.

Para cumplir con los objetivos establecidos se diseñó y ejecutó la siguiente estrategia experimental (Figura 4):

- 1.- Obtención del DNA genómico a partir de las muestras de tumor de tejido fresco y de tejido embebido en parafina.

2.- Amplificación de la región del exón 1 del oncogen K-ras, que incluye a los codones 12 y 13 mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (referida como PCR por sus siglas en inglés), haciendo uso de oligonucleótidos que generan sitios de restricción nuevos, que dependiendo de si los codones están o no mutados, son reconocidos por unas u otras enzimas de restricción.



**Figura 4. Estrategia experimental.** Se extrajo el DNA tanto de tumores frescos como de embebidos en parafina. Este se sometió a PCR para la región del gen K-ras que abarca los codones 12 y 13. Finalmente, corte con enzimas de restricción claves, permitieron identificar mutaciones en dichos codones. En los que no, se optó por la secuenciación nucleotídica.

3.- Comprobación de la existencia de los nuevos sitios de restricción en los productos amplificados, mediante su digestión con enzimas de restricción.

4.- Diferenciación de los fragmentos de restricción mediante su visualización después de someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida.

5.- Secuenciación de las muestras que presenten mutación y que no puedan ser identificadas por la técnica descrita en los puntos 2-4.



## 2.2.1 Implementación de las técnicas de extracción de DNA.

Para realizar las extracciones, nos basamos en las técnicas descritas anteriormente por Vogelstein y cols. (22), con algunas modificaciones. Una vez extraído el DNA, tanto su integridad, como su pureza y su concentración se determinaron por electroforesis en gel de agarosa.

### 2.2.1.A Extracción de DNA de tejido fresco.

Se descongelaron las muestras de tejido fresco y en condiciones asépticas se pesaron de 10 a 50 mg. Utilizando una hoja de bisturí, se cortaron en pedacitos lo más pequeños posibles y se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 ml, los cuales contenían 1 ml de buffer de lisis (500 mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 9, 0.2 ml de SDS 10% y 0.15 ml de proteinasa K 10 mg/ml). Se incubaron a 48°C con agitación vigorosa durante 12 a 14 horas, para finalmente inactivar la enzima 95°C durante 15 min.

Se transfirió todo el contenido a tubos falcon de 15 ml para realizar una extracción fenol:cloroformo 1:1. Usando el vortex se agitó durante 5 min y luego se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo falcon de 15 ml, repitiendo la extracción dos veces más.

La fase acuosa final se transfirió a un tubo falcon de 15 ml, se agregaron 0.33 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló suavemente por inversión, se dejó precipitar a -70°C durante una hora, y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Esta se secó y se resuspendió en TE (1X). Para asegurar que el DNA se resuspendiera homogéneamente, se dejó durante 12 a 14 horas en una

plataforma agitadora vertical. Finalmente, se procedió a determinar su concentración y calidad.

### **2.2.1.B Extracción de DNA de tejido embebido en parafina.**

Esta técnica básicamente consta de 2 fases:

#### **1. Desparafinización e hidratación.**- Esta fase la realizamos de dos formas:

Para una parte de las muestras (25) se realizaron los cortes de 10  $\mu\text{m}$  y se montaron en laminillas de 3 a 5 cortes. Los cortes se colocaron en una canastilla para portaobjetos y se calentaron en un horno a 60°C (constante) durante 30 min, inmediatamente después se sumergió la canastilla junto con los cortes, en xilol durante 5 min. Se repitió el paso anterior cambiando la solución de xilol. Posteriormente hicimos inmersiones de la canastilla por 5 min en cada una de las siguientes soluciones (en orden): etanol 100%, etanol 70%, etanol 30%, PBS (Buffer de fosfatos, pH 7.4). Se transfirieron los cortes con ayuda de una aguja a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

Para el resto de las muestras se realizaron los cortes y éstos se pasaron directamente a un tubo de 1.5 ml. Se calentaron de la misma forma. Inmediatamente después se les adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de xilol y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min. Con ayuda de una pipeta recuperamos el sobrenadante, el cual se desechó. Adicionamos nuevamente 500  $\mu\text{l}$  de xilol y así de la misma forma se adicionaron los demás reactivos, centrifugando entre cada uno de ellos (etanol 100%, etanol 70%, etanol 30% y PBS).

#### **2. Extracción.**- Después de que transferimos los cortes, se les adicionaron 200 $\mu\text{l}$ de buffer de lisis (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40 y 0.5% Tween 20; pH=8) y 20 $\mu\text{l}$ de proteinasa K (10 mg/ml). Se digirieron durante toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa. Después se inactivó la proteinasa K a 95°C durante 10 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se dividió en dos partes: una se almacenó a -70°C y otra a -20°C, ya que existen dudas en cuanto a cual de las dos temperaturas es mejor para su almacenamiento. Pero antes de congelarse los

sobrenadantes, se procedió a determinar la calidad del DNA y a tomar directamente la alícuota para la PCR (5  $\mu$ l).

### 2.2.2 Electroforesis en gel de Agarosa.

La estimación de la cantidad de DNA en la muestra de interés, se llevó a cabo sobre la banda de DNA genómico una vez separada por electroforesis, utilizando la fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio, intercaladas entre sus bases e inducida por la radiación UV, comparándola con la fluorescencia de una serie de estándares. Así mismo, se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético, evidenciando la degradación por la presencia de un barrido, el cual inicia en la porción inferior de la banda principal del DNA y se proyecta hacia la parte baja del gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (0.089 M Tris-Borato y 0.089 M ácido bórico; pH=7.9), disolviendo con calor. Una vez gelificado en el molde, se depositó el gel en una cámara de electroforesis y se cubrió con buffer. Se mezcló 1  $\mu$ l de una dilución 1:10 de la muestra a cuantificar con 4  $\mu$ l de TE y 1  $\mu$ l de jugo azul 6X (0.3% azul de bromofenol, 0.3% xilencianol y 30% glicerol). De la misma manera, se preparó una serie de estándares cambiando el DNA a cuantificar por cantidades conocidas y variables de las muestras estándares. La serie de preparaciones se colocó en los carriles del gel y se realizó electroforesis inicialmente a 80 V mientras se internaba el colorante en el gel y posteriormente a 110 V por alrededor de 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel).

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2  $\mu$ g/ml por 5 ó 10 min y luego se lavó varias veces para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación en un transiluminador de luz UV. Se determinó la concentración del DNA por comparación visual de la intensidad de la fluorescencia de la banda de interés con la de los estándares. La integridad se evaluó tomando en cuenta la intensidad del barrido, la cual determina el grado de degradación; la ausencia de tal barrido indica que el DNA extraído está íntegro.

## 2.2.3 Implementación de la técnica de PCR y cortes con enzimas de restricción diagnósticas.

### 2.2.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Gracias a la técnica de la PCR es posible obtener millones de copias de un gen o segmento de DNA específico, del cual existe una o pocas copias dentro de los cientos de miles que constituyen el genoma humano (25, Figura 5).

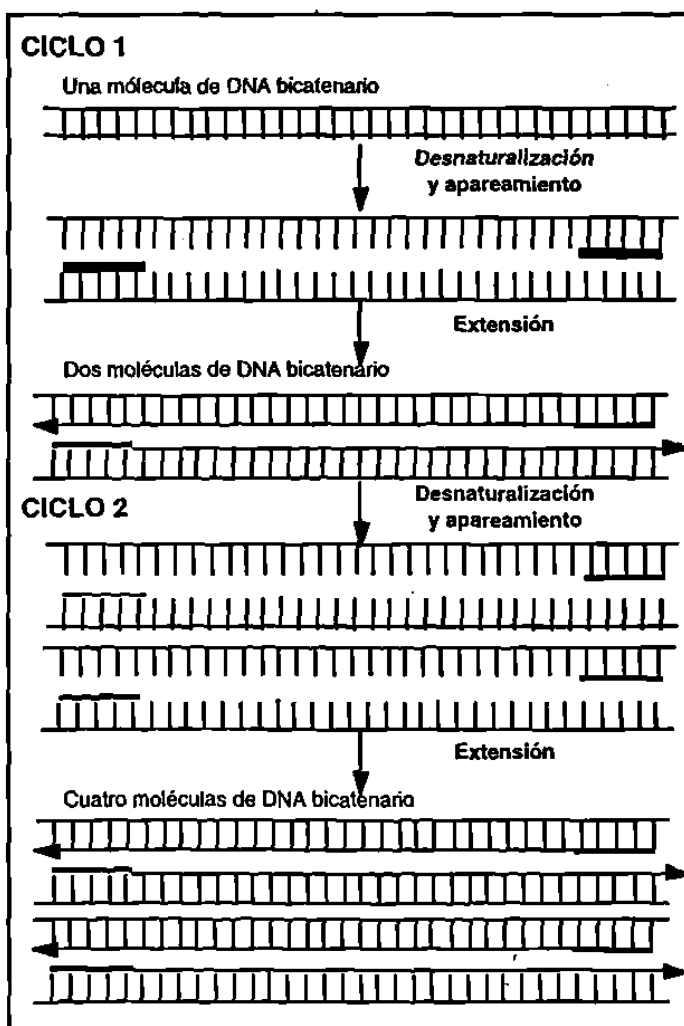
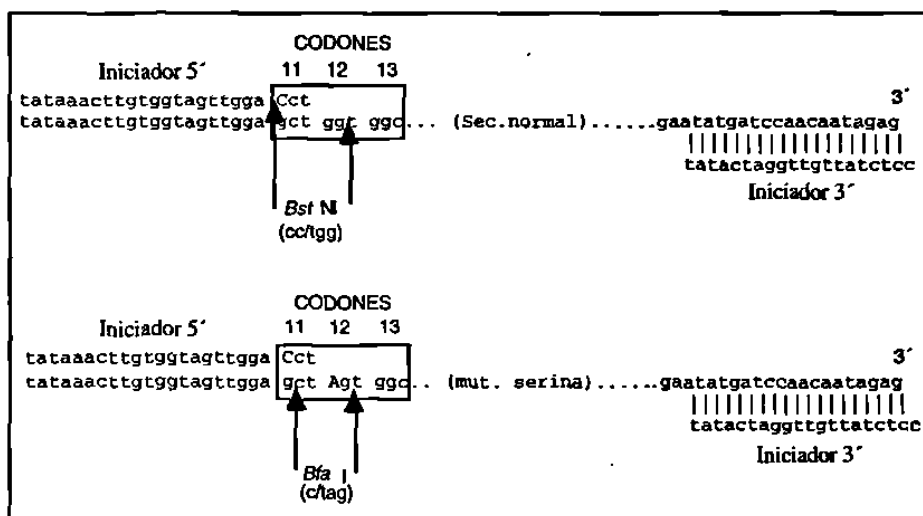


Figura 5. Esquema que representa dos Ciclos de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). En cada ciclo se duplican las cadenas de DNA blanco existentes al inicio. Cada ciclo consta de 3 pasos: desnaturalización de las cadenas de DNA, apareamiento de los iniciadores que permiten a la DNA polimerasa sintetizar una nueva cadena complementaria. Al resolver el producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa, se observa una banda correspondiente al fragmento de DNA amplificado millones de veces.

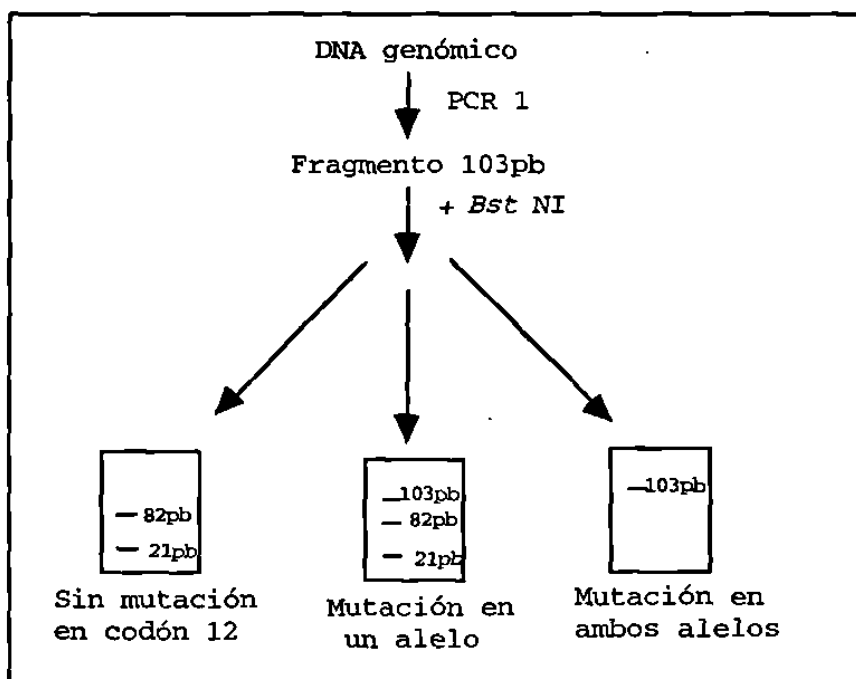
En este estudio se utilizó una variante de la PCR que hace uso de oligonucleótidos que incorporan sustituciones estratégicas que crean sitios de restricción que se traslapan con las posiciones potencialmente activables de los codones 12 y 13. El proceso de búsqueda de mutaciones inició cuando se detectó la pérdida de dicho sitio artificial de restricción diagnóstico en el codón en cuestión, a causa de la presencia de una mutación activadora del proto-oncogen (ver ejemplo en la figura 6). Luego, el uso de otras enzimas de restricción cuyos sitios de restricción se crean con dichas mutaciones, permitieron diferenciar algunas de las mutaciones presentes.



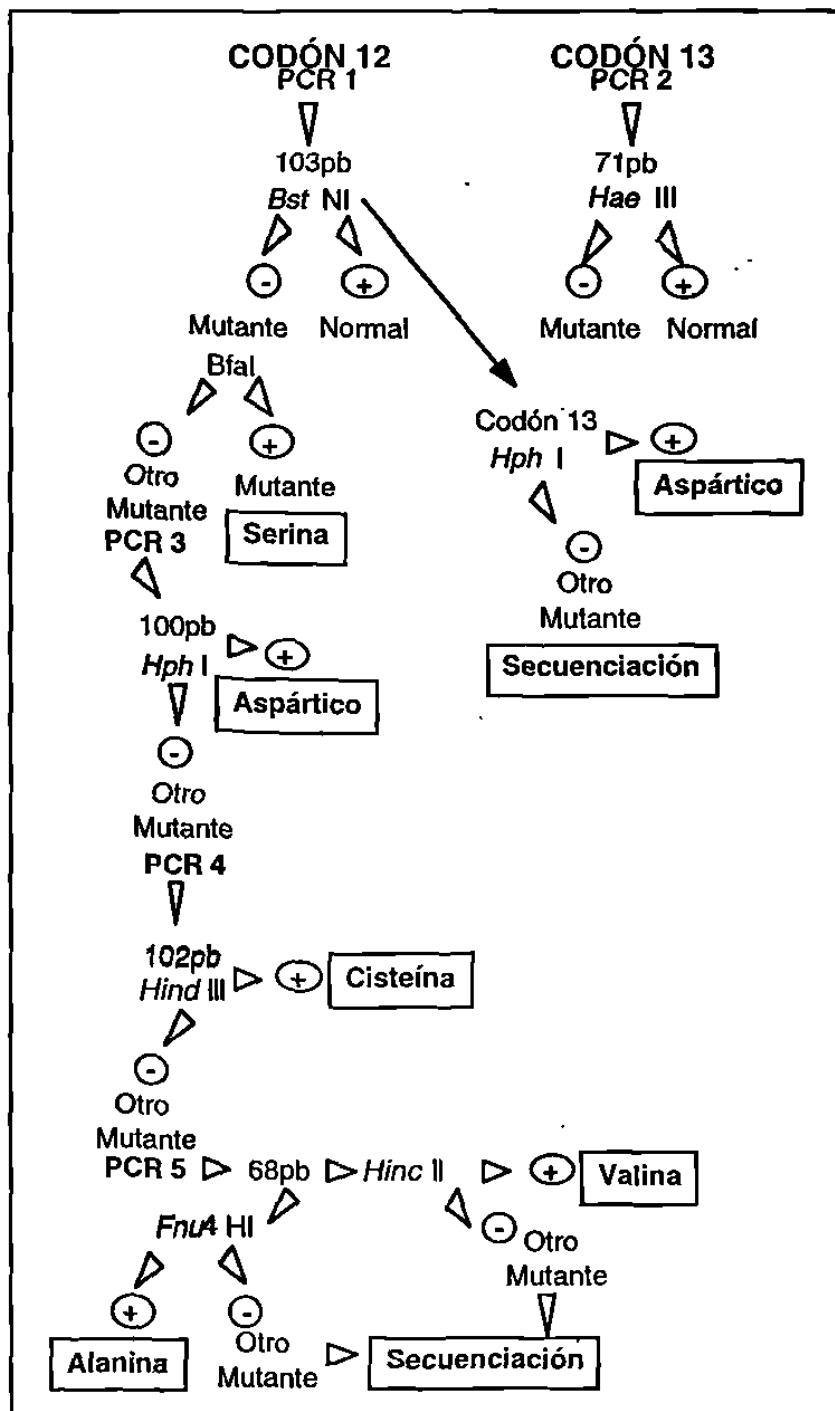
**Figura 6. Detección de la mutación en el codón 12 que cambia glicina a serina.** El primer 5' de la PCR termina justo en el codón 11 (cct) e introduce un sitio *Bst* NI (CC T GG) cuya penúltima G coincide con la primera posición del codón 12 (normalmente GGT), que en este caso está cambiada hacia A, alterando el codón, para que cifre para serina (AGT). Por ello, mientras *Bst* NI ya no corta, delatando la presencia de una mutación en el codón 12, *Bfa* I sí lo hace e identifica a ésta como la de la serina (substitución de G→C).

El estudio comenzó con la detección de mutaciones en el codón 12. Después de corroborar la amplificación, se procedió a digerir con la enzima *Bst* NI, cuyo sitio de reconocimiento se traslapa con la secuencia normal

alrededor de dicho codón en el proto-oncogen K-ras (Figura 7). En caso de no encontrarse mutación en el codón 12, se procedió a buscar mutaciones en el codón 13. Las mutaciones en el codón 13 se detectaron de la misma forma que para el codón 12, pero utilizando otro juego de oligonucleótidos, los cuales crean un sitio de restricción para la enzima *Hae* III, en caso de estar presente la secuencia normal del proto-oncogen k-ras. En caso de que los codones 12 o 13 estuvieran mutados, se procedió a buscar el tipo de mutación presente, basándonos en la estrategia que se muestra en la figura 8.



**Figura 7. Estrategia para detectar si el codón 12 del proto-oncogen K-ras está mutado.** El procedimiento incluye amplificar el primer exón del gen, que es donde reside el codón de interés, en este caso el 12. Después, el producto de la amplificación se incuba con la endonucleasa de restricción *Bst* NI, que cortará en ambos alelos, siempre y cuando dicho codón no esté mutado.



**Figura 8. Estrategia general.** El estudio comienza con los PCRs 1 y 2, los cuales nos detectan si existen o no mutaciones en los codones 12 y 13. En caso de detectarse que el codón 12 esté mutado, se procede a realizar el corte con la enzima *Bfa* I para identificar el cambio de serina y en caso de que no los PCRs 3, 4 y 5, con sus correspondientes digestiones para detectar las mutaciones para serina, aspártico, cisteína, valina y alanina respectivamente. Si se presenta mutación en el codón 13 se realiza el PCR1 y se digiere con *Hph* I para detectar la mutación de aspártico.

Para la amplificación de los codones 12 y 13 las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas a continuación en la tabla 2:

**Tabla 2. Condiciones de reacción para las PCRs.**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración Final
Buffer PCR (10X)	2.0	1X
Primer 5' (5 $\mu$ M)	4.0	1 $\mu$ M
Primer 3' (5 $\mu$ M)	4.0	1 $\mu$ M
dNTP's (10 mM)	0.4	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.8	1 mM
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.5	0.125U/ $\mu$ l
DNA	variable	7.5 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O ultrapura	3.3	---
Volumen final	20	---

Los iniciadores utilizados dependieron del codón y la mutación que estaba siendo investigada, según se describe en las tablas 4 y 5. El programa del termociclador se describe a continuación en la Tabla 3:

**Tabla 3. Condiciones del programa del termociclador para las PCRs**

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnat. inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
3	55°C	30 seg	Apareamiento
4	72°C	30 seg	Extensión
(2-4)24			24 ciclos*
5	72°C	7 min	Extensión final

\* Ciclo: 2-4

El resultado de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### 2.2.3.2 Rastreo de mutaciones por cortes con enzimas de restricción.



### 2.2.3.2.A Detección de mutaciones en el codón 12.

Comenzamos con el PCR1 siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas y usando lo iniciadores correspondientes (ver la tabla 4). Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10µl del producto amplificado con las enzima *Bst* NI para buscar la presencia o ausencia de mutación en el codón 12. En caso de presentarse la mutación, se procedió a digerir con la enzima *Bfa* I y realizar los PCR3, 4 y 5 con sus correspondientes digestiones para detectar las mutaciones de serina, aspártico, cisteína, valina y alanina (los resultados se evaluaron conforme a lo descrito en la tabla 4), respectivamente. Todas las digestiones se realizaron siguiendo las condiciones dadas por el fabricante, digiriendo 10µl de producto amplificado. En caso de presentarse mutación en el codón 12, pero que ésta fuera diferente a las detectadas por el método, se procedió a secuenciar.

**Tabla 4. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen K-ras.** En la tabla se observan los distintos PCRs utilizados para detectar cada una de las mutaciones presentes en el codón 12, así como lo iniciadores para cada uno de ellos. También se observan el tamaño del producto de la amplificación (PA) en cada caso y el sitio de reconocimiento de las enzimas utilizadas para la detección de las mutaciones, así como el tamaño de las bandas esperadas: normal=S/Mut (sin mutación); mutación heterocigota=MUT/HET; mutación homocigota =MUT/HOM.

Codón 12 (ggt)	INICIADORES	PA (pb)	ENZIMA*	S/Mut (pb)	Mut/HET (pb)	Mut/HOM (pb)																																										
PCR1 Todas	961107-103 5'tataaactgtggtagtgaaCCT 3'	103	<i>Bst</i> NI 5'...CC/TGG...3' 3'...GGA/CC...5'	82	103	103																																										
				21	21		Serina (agt)	961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	103	<i>Bfa</i> I 5'...C/TAG...3' 3'...GATC...5'	103	103 81 22	81 22	PCR3 Aspártico (gat)	961107-105 5'acttggttagtggaGGTG 3' 961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	99	<i>Hph</i> I 5'...GGTGA(N)/...3' 3'...CCACT(N)/...5'	99	99	82	99	82 17	17	PCR4 Cisteína (tgt)	961107-104 5'aacttggttagtgAAGCT3' 961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	102	<i>Hind</i> III 5'...A/AGCTT...3' 3'...TTCGA/A...5'	102	102	85	102	85 17	17	PCR5 Valina (gtt)	961106-102 5'gcctgctgaaaatgactgaa 3'	67	<i>Hinc</i> II 5'...GTP/PuAC...3' 3'...CAPU/PITC...5'	67	67	45	67	45 22	22	Alanina (gct)	961107-107 5'aggcactctgacctagctca 3'	67	<i>Fnu</i> 4HI 5'...GC/NGC...3' 3'...CGN/CG...5'	67
Serina (agt)	961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	103	<i>Bfa</i> I 5'...C/TAG...3' 3'...GATC...5'	103	103 81 22	81 22																																										
PCR3 Aspártico (gat)	961107-105 5'acttggttagtggaGGTG 3' 961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	99	<i>Hph</i> I 5'...GGTGA(N)/...3' 3'...CCACT(N)/...5'	99	99	82																																										
				99	82 17	17																																										
PCR4 Cisteína (tgt)	961107-104 5'aacttggttagtgAAGCT3' 961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'	102	<i>Hind</i> III 5'...A/AGCTT...3' 3'...TTCGA/A...5'	102	102	85																																										
				102	85 17	17																																										
PCR5 Valina (gtt)	961106-102 5'gcctgctgaaaatgactgaa 3'	67	<i>Hinc</i> II 5'...GTP/PuAC...3' 3'...CAPU/PITC...5'	67	67	45																																										
				67	45 22	22																																										
Alanina (gct)	961107-107 5'aggcactctgacctagctca 3'	67	<i>Fnu</i> 4HI 5'...GC/NGC...3' 3'...CGN/CG...5'	67	67	42																																										
				67	42 25	25																																										

### 2.2.3.2.B Detección de mutaciones en el codón 13.

Para realizar la PCR2 se utilizaron los iniciadores correspondientes (tabla 5). Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10 $\mu$ l del producto amplificado con la enzima *Hae* III. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las especificadas por el fabricante y los resultados se analizaron de acuerdo a la tabla 3. En caso de presentarse mutaciones en el codón 13, se procedió a realizar la PCR1 y se digirió con la enzima *Hph* I para detectar la mutación de aspártico. En caso de estar mutado el codón 13 pero por una mutación que no fuera la de aspártico, se procedió a secuenciar.

**Tabla 5. Detección de mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras.** En la tabla se observan los distintos PCRs utilizados para detectar cada una de las mutaciones presentes en el codón 13, así como los iniciadores para cada uno de ellos. También se observan el tamaño del producto de la amplificación (PA) en cada caso y el sitio de reconocimiento de las enzimas utilizadas para la detección de las mutaciones, así como el tamaño de las bandas esperadas: normal=S/Mut (sin mutación); mutación heterocigota=MUT/HET; mutación homocigota=MUT/HOM.

Codón 13 (ggt)	INICIADORES	PA (pb)	ENZIMA*	S/Mut (pb)	Mut/HET (pb)	Mut/HOM (pb)
PCR2 Todas	961106-102 5'gcctgctgaaaatgactgaa 3'	71	<i>Bst</i> NI 5'...CC/TGG...3' 3'...GGA/CC...5'	48	71	71
	961108-108 5'cgtcaaggcactcttgcttagg 3'			23	23	
PCR1 Aspártico (gat)	961107-103 5'tataaactgtggtagttaaCCT 3'	103	<i>Hph</i> I 5'..GGTGA(N)8/3' 3'..CCTACT(N)7/5'	103	103	79
	961107-106 5'cctctattgtgatcatat 3'				79	24

### 2.2.3.3 Visualización de los fragmentos de restricción.

Los fragmentos de restricción se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrílamida al 12%, que se prepararon como se describe a continuación en la tabla 6:

**Tabla 6. Reactivos utilizados en la preparación de los geles de poliacrilamida al 12%.**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>
Agua destilada	15
TBE 10X	3
Acrilamida/bisacrilamida al 30%	12
*Persulfato de amonio al 10%	0.5
*TEMED	0.05

\* Catalizadores (se agregan justo antes de vaciarse el gel en el molde pues desencadenan la polimerización súbita del gel).

Se mezcló todo el producto de la digestión con 3 o 4  $\mu$ l de jugo azul 6X, dependiendo si el volumen de reacción era de 15 o 20  $\mu$ l. La serie de preparaciones se colocaron en los carriles del gel, como controles se usaron un producto amplificado sin digerir y un testigo positivo para la mutación y se realizó la electroforesis (inicialmente a 80 V mientras se internaba el colorante en el gel y posteriormente a 170 V por alrededor de 4 horas), dejando correr el azul de bromofenol, tres cuartas partes del gel.

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2  $\mu$ g/ml por 5 ó 10 min y luego se lavó varias veces para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación en un transiluminador de luz UV y poder deducir la presencia de las mutaciones a partir del patrón de digestión obtenido de los productos amplificados.

#### **2.2.4 Secuenciación de las muestras no detectadas.**

Después de analizar las muestras realizando la estrategia descrita anteriormente, se encontraron dos muestras que presentaban mutación en el codón 12, que la estrategia y las enzimas no permitieron establecer su naturaleza, por lo que procedimos a realizar la secuenciación nucleotídica del DNA amplificado en cuestión.

#### 2.2.4.1 Preparación de la muestra.

Se amplificó el codón 12 utilizando los iniciadores 103 y 106. Después de verificar la amplificación en geles de agarosa al 2%, se procedió a digerir con la enzima *Bst* NI, siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. La banda de interés no digerida, se cortó con un bisturí estéril y el DNA se recuperó por centrifugación utilizando como filtro fibra de vidrio. Después de la centrifugación, el DNA se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%, para luego centrifugarla a 14,000 rpm por 20 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente y el precipitado se dejó secar y luego se resuspendió en 10  $\mu$ l de TE. Se realizó una dilución 1:10 y se tomaron 5  $\mu$ l para reamplificar con las mismas condiciones de PCR, utilizando los mismos iniciadores. Después de verificar la amplificación, se procedió a purificar el producto de amplificación pasándolo a través de una columna de sephacril. Para ésto, se procedió a depositar el producto amplificado en la columna y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. Lo que se recuperó del filtrado fue lo que se utilizó para la secuenciación nucleotídica.

#### 2.2.4.2 Secuenciación nucleotídica.

Los productos de PCR se secuenciaron utilizando el iniciador 3' (106) con el estuche de secuenciación cíclica por PCR, utilizando el Amplicycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) y  $\alpha$ P<sup>32</sup>-ATP. Las muestras se analizaron con un secuenciador Genomyx LR System.

#### 2.2.5 Análisis estadístico.

Los datos fueron comparados mediante la prueba de ji cuadrada ( $P > 0.05$ ).

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

Se recolectaron 51 muestras de tejido fresco y 50 muestras de tejido embebido en parafina, que se analizaron por igual. De los 101 pacientes, 37 fueron mujeres y 64 hombres. El rango de edad fue de 7 a 92 años. Los datos de distribución de los pacientes por edades se muestran en la tabla 7. De las neoplasias recolectadas, 18 (17.8%) eran de colon ascendente, 3 (2.9%) de colon transverso, 34 (33.6%) de colon descendente y 36 (35.6%) de recto. Hubo 10 tumores de colon cuya localización fue desconocida. Todo esto hace un total de 65 (64.3%) tumores presentes en colon y 36 (35.6%) en recto. El mayor número de tumores se presentó en el colon izquierdo.

**Tabla 7. Distribución por edades de los pacientes.**

EDAD	MUJERES	%	HOMBRES	%
0 - 10	0	0.00	2	1.98
11 - 20	1	0.99	1	0.99
21 - 30	2	1.98	4	3.96
31 - 40	3	2.97	6	5.94
41 - 50	6	5.94	8	7.92
51 - 60	7	6.93	14	13.86
61 - 70	8	7.92	10	9.9
71 - 80	6	5.94	13	12.87
81 - 90	4	3.96	5	4.95
>90	0	0.00	1	0.99
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>36.63</b>	<b>64</b>	<b>63.36</b>

De acuerdo a la histología de las neoplasias, 9 (8.9%) fueron pólipos benignos, 33 (32.6%) se clasificaron como adenomas y 59 (58.4%) como adenocarcinomas; en la tabla 8 se especifica la subclasificación.

**Tabla 8 Subclasificación de los Adenomas y Adenocarcinomas.**

<b>Adenomas</b>	<b>33</b>	<b>Adenocarcinomas (AdCa)</b>	<b>59*</b>
adenoma tubular	9	AdCa bien diferenciado	14
adenoma vellosos	7	AdCa mod. diferenciado	37
adenoma mixto	17	AdCa poco diferenciado	7

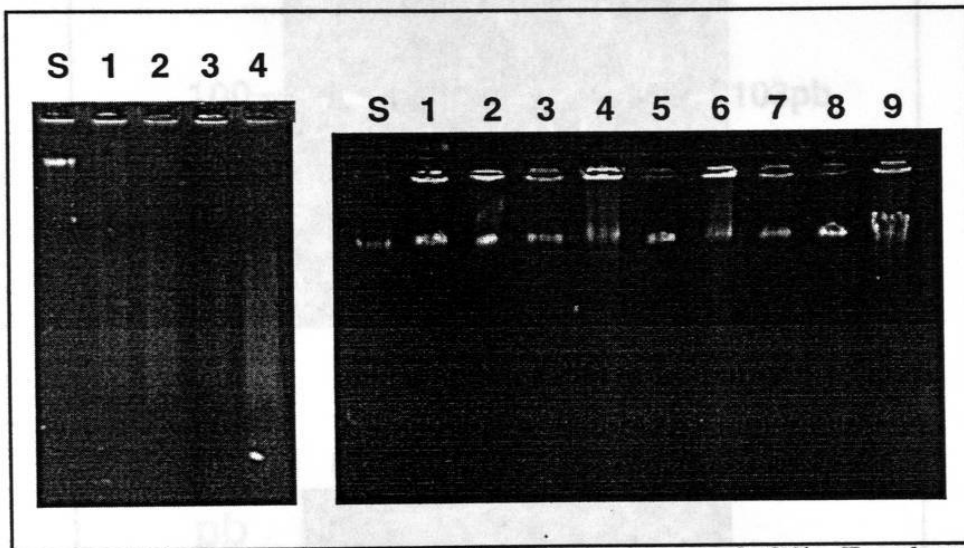
\* De 1 adenocarcinoma se desconocía su clasificación.

### **3.2 DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR.**

#### **3.2.1 Banco de DNA genómico.**

Se extrajo DNA genómico a partir de 51 pacientes de los cuales teníamos muestras de tejido fresco. Dichos DNAs se integraron en un banco (DNA de los pacientes). Las muestras en dicho banco tienen una concentración que oscila entre 25 y 750 ng/ $\mu$ l, mientras que el volumen está entre 20 y 150  $\mu$ l, para dar un rango de cantidades de DNAs recuperados de las muestras entre 500 ng y 112.5 $\mu$ g. La integridad del DNA en las muestras fue aceptable, ya que sólo en algunas cuantas se observó una ligera degradación del DNA. Además del DNA tumoral, en el banco se cuenta con los DNAs obtenidos de tejido de transición (22), así como los del tejido normal (15) de las muestras de las cuales se lograron obtener los tres tipos de tejidos.

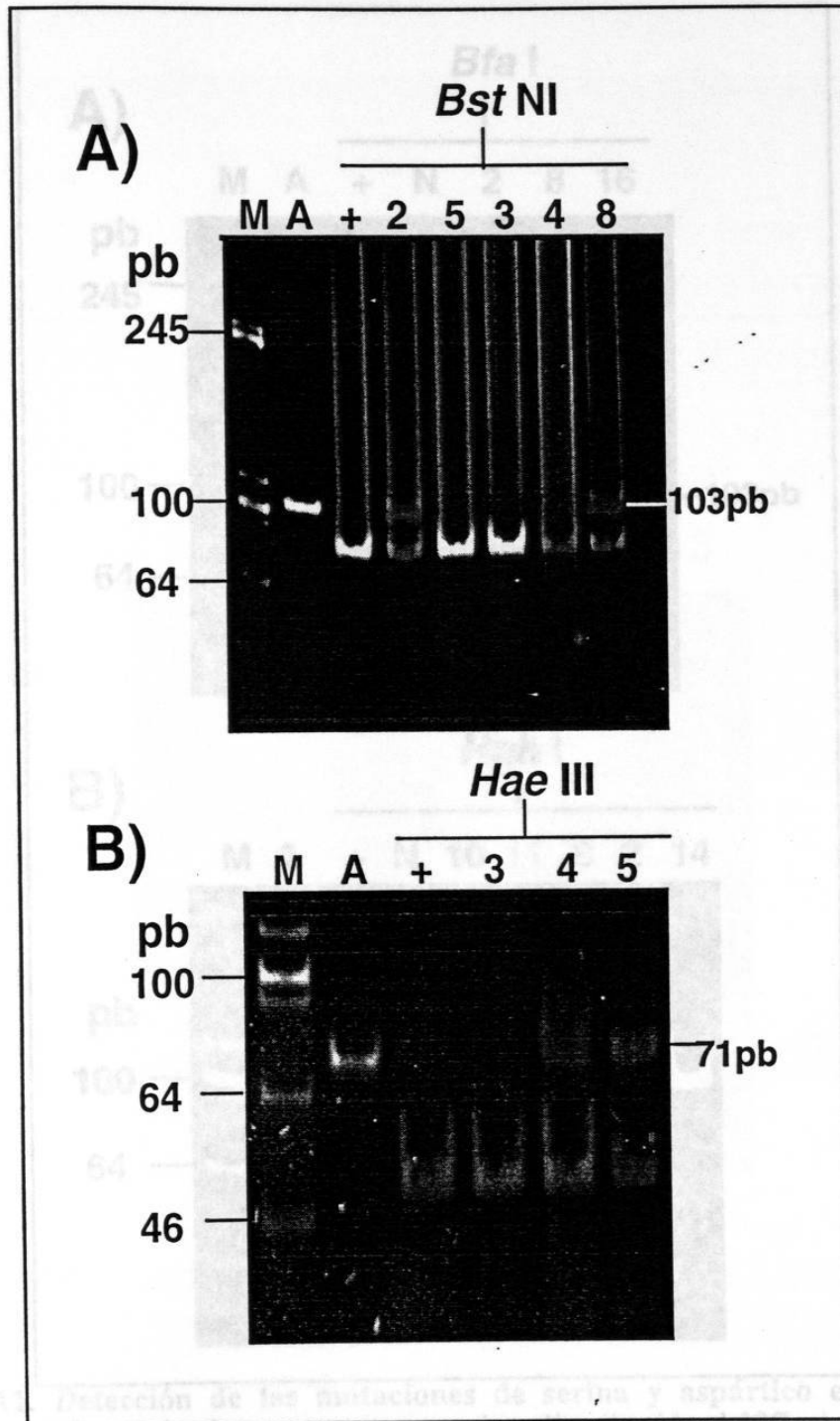
El DNA extraído de las 50 laminillas presentó un alto grado de degradación, por lo que se procedió a su análisis inmediato, así como a almacenarlas en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$ , para tratar de conservarlo lo mejor posible, ya que existen protocolos que recomiendan una u otra temperatura. En la figura 9 se muestran algunos de los DNAs extraídos de las muestras de tejido en parafina y fresco.



**Figura 9.** Análisis de DNAs en geles de agarosa al 2%. En el gel de la izquierda se resolvieron DNAs extraídos a partir de diferentes muestras (1-4) de tejido embebido en parafina, mientras que en el de la derecha se resolvieron DNAs correspondientes a las muestras (1-7) de tejido fresco. S=Estándar.

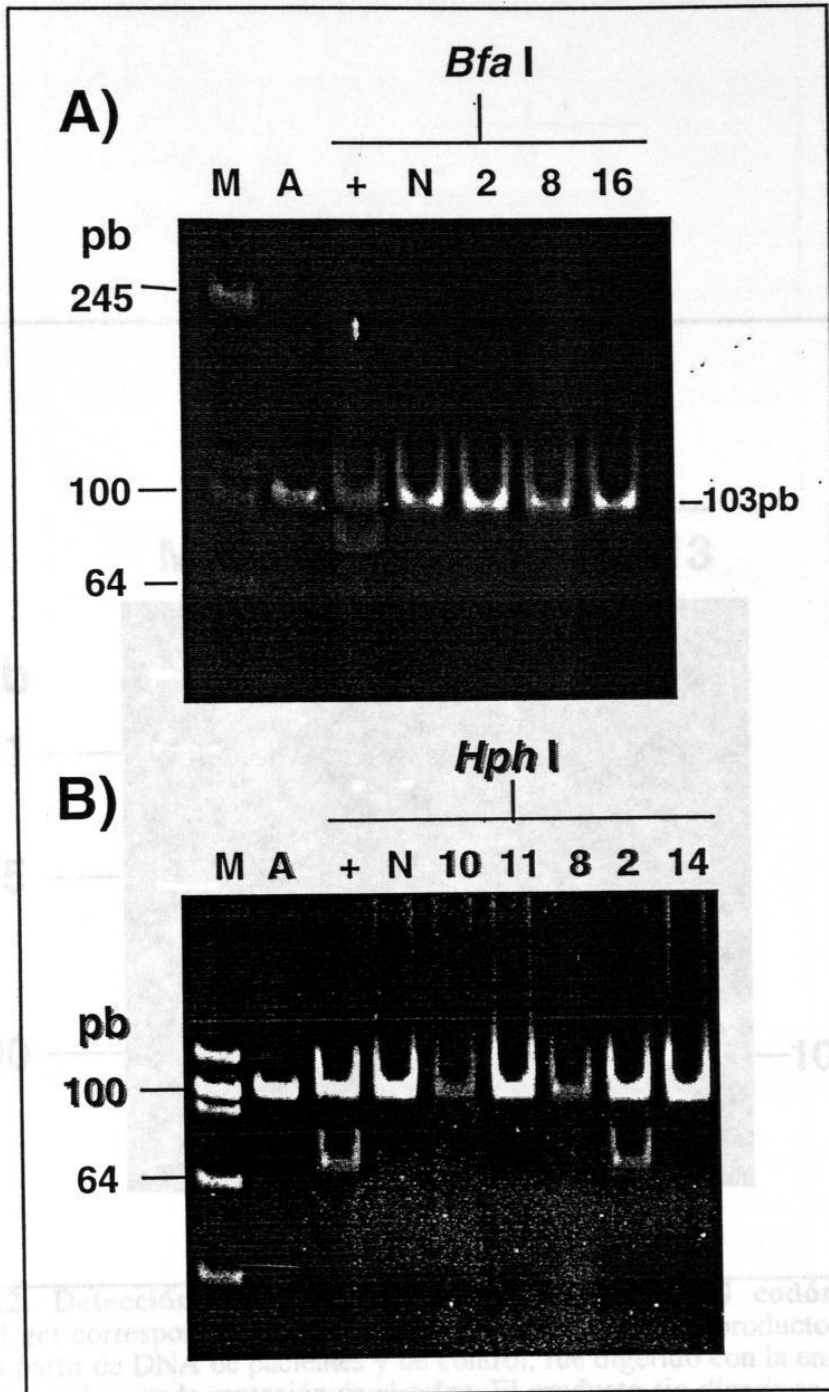
### 3.2.2 PCR + cortes con enzimas de restricción diagnósticas.

Aunque el protocolo utilizado se basó en lo publicado por Shibata y cols. (23) y Kumar y cols. (26), se realizó una optimación quedando las concentraciones anteriormente mencionadas en materiales y métodos (3.2.3 - 3.2.5). En la figura 10 se muestran los productos de digestión para las PCR1 y PCR2, los cuales detectan mutaciones en los codones 12 y 13. Finalmente en las figuras 11, 12 y 13 se muestran los productos de digestión para las diferentes mutaciones analizadas del codón 12.

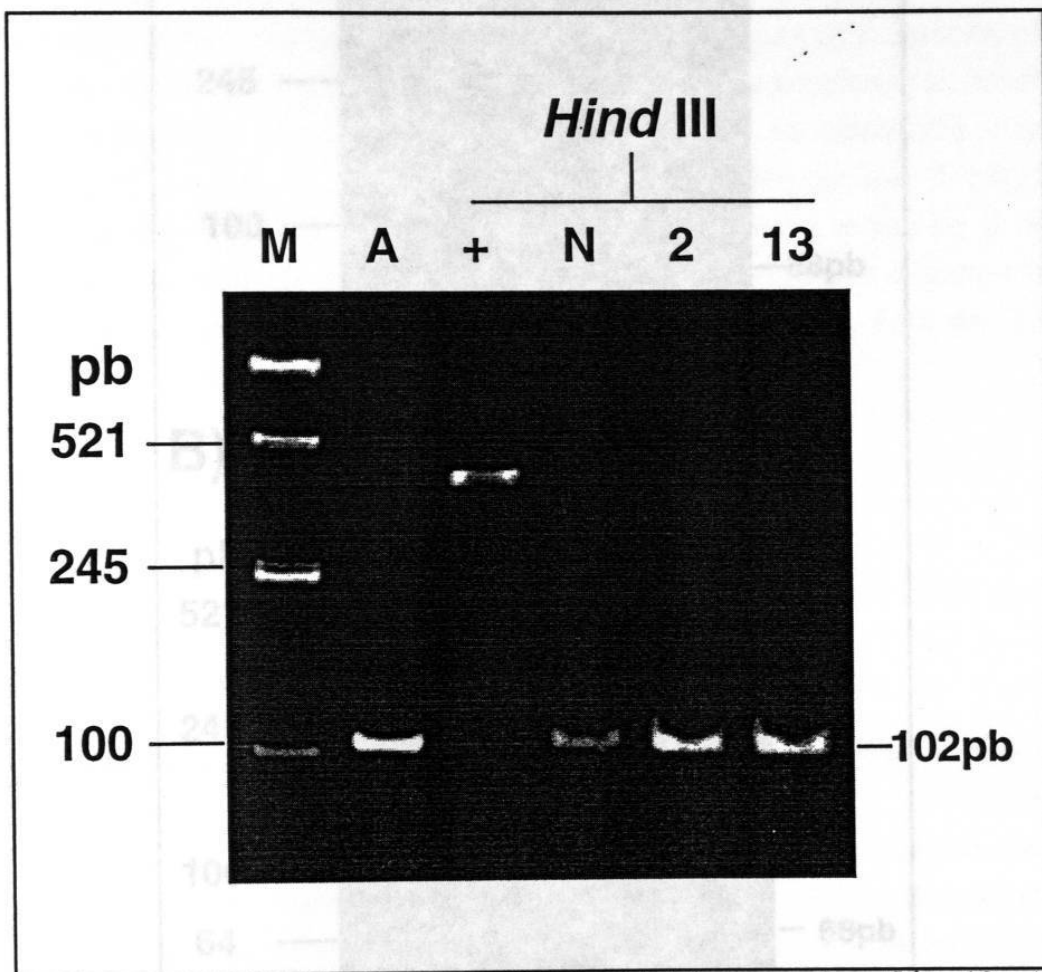


**Figura 10. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras.** En ambas fotos, el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. A. El producto de la PCR1, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Bst* NI que permite evidenciar mutaciones en el codón 12. El producto sin digerir se muestra en el carril A; +=testigo de corte (DNA normal); 2 y 8=Pacientes mutados para el codón 12; 3, 4 y 5=Pacientes normales para el codón 12. B. El producto de la PCR2, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hae* III que permite evidenciar mutaciones en el codón 13. A=Producto sin digerir; +=Testigo de corte (DNA normal); 4 y 5=Pacientes mutados para el codón 13; 3=Paciente normal para el codón 13.

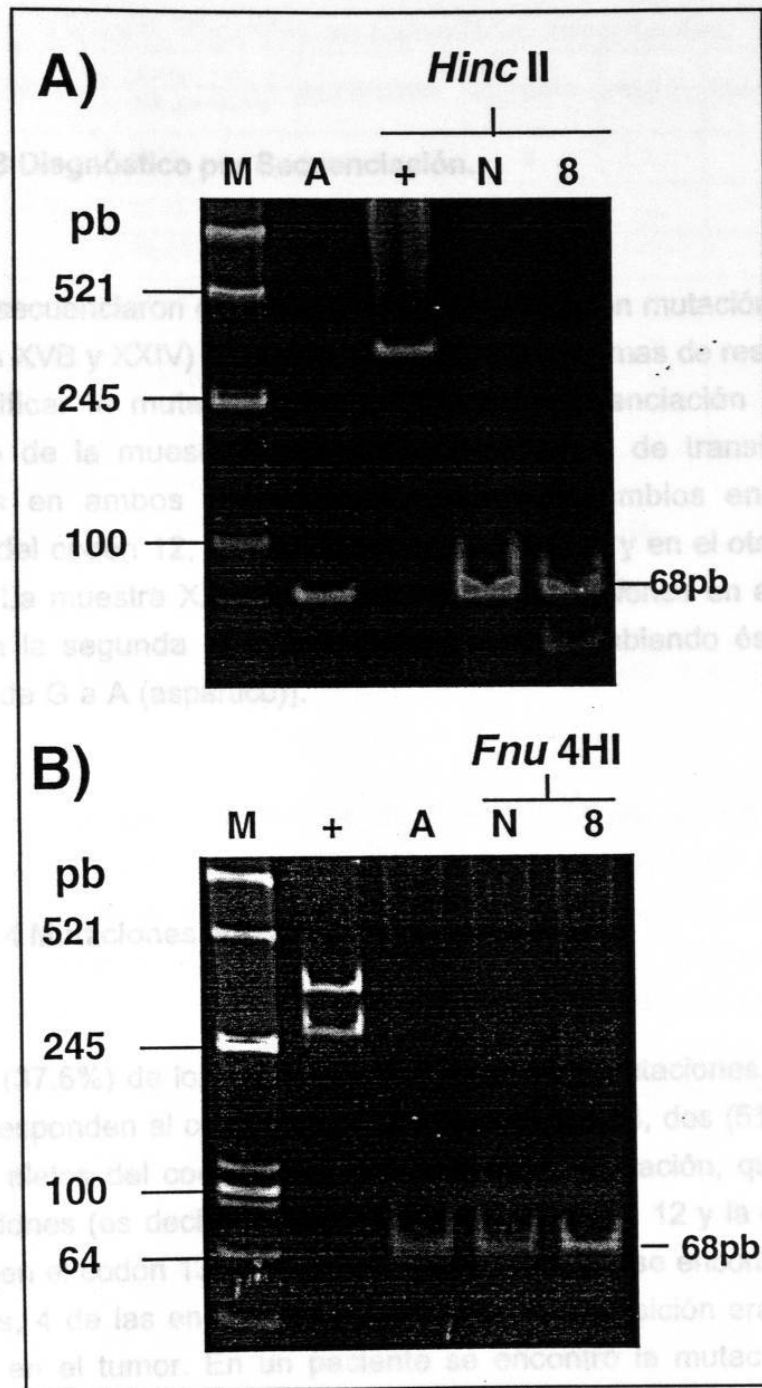




**Figura 11. Detección de las mutaciones de serina y aspártico en el codón 12.** En ambas fotos, el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. **A.** El producto de la PCR1, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Bfa* I que permite evidenciar la mutación de serina. El producto sin digerir se muestra en el carril A; +=testigo de corte para la mutación de serina; N, 2, 8 y 16=Pacientes sin esta mutación. **B.** El producto de la PCR3, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hph* I que permite evidenciar la mutación de aspártico. A=Producto amplificado; +=Testigo de corte para la mutación de aspártico; 2=muestra de un paciente positivo para la mutación de aspártico en el codón 12; N, 8, 10, 11 y 14=Pacientes sin esta mutación.



**Figura 12. Detección de la mutación de cisteína en el codón 12.** Aquí también el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. El producto de la PCR4, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hind* III que permite evidenciar la mutación de cisteína. El producto sin digerir se muestra en el carril A; +=testigo de corte para la mutación de cisteína(pUC19); N, 2 y 13=Pacientes sin esta mutación.



**Figura 13. Detección de las mutaciones de valina y alanina en el codón 12.** En ambas fotos, el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. **A.** El producto de la PCR5, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hinc II* que permite evidenciar la mutación de valina. El producto sin digerir se muestra en el carril A; +=testigo de corte para la enzima (pUC19); N=DNA normal para la mutación; 8=muestra de un paciente positivo para la mutación de valina en el codón 12. **B.** El producto de la PCR5, obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Fnu 4HI* que permite evidenciar la mutación de alanina. A=Producto amplificado; +=testigo de corte para la enzima (DNA con el sitio de corte); N=DNA normal para la mutación; 8=muestra de un paciente sin la mutación.

### 3.2.3 Diagnóstico por Secuenciación.

Se secuenciaron dos muestras que presentaron mutación en el codón 12 (muestra XVB y XXIV) y que por los cortes con enzimas de restricción no se logró identificar la mutación en cuestión. La secuenciación del producto amplificado de la muestra XVB, que era de tejido de transición, mostró mutaciones en ambos alelos, consistentes en cambios en el segundo nucleótido del codón 12, [en uno de G por T (valina), y en el otro de G por C (alanina)]. La muestra XXIV también presentó mutaciones en ambos alelos, también en la segunda posición del codón 12 [cambiando ésta de G a C (alanina) y de G a A (aspártico)].

### 3.2.4 Mutaciones encontradas.

38 (37.6%) de los 101 tumores presentaron mutaciones. De éstas, 20 (53%) corresponden al codón 12, 15 (39%) al codón 13, dos (5%) mutaciones en ambos alelos del codón 12 y una (3%) doble mutación, que involucra a ambos codones (es decir, una en un alelo en el codón 12 y la otra en el otro alelo pero en el codón 13). En los tejidos de transición se encontraron 5 (23%) mutaciones, 4 de las encontradas en el tejido de transición eran las mismas presentes en el tumor. En un paciente se encontró la mutación sólo en el tejido de transición.

En la tabla 19, que se muestra a continuación, se describen los hallazgos de los cambios aminoacídicos ocasionados por las mutaciones encontradas, así como sus frecuencias.

**Tabla 9. Cambios aminoacídicos encontrados.**

TEJIDO	MUTACIONES (de glicina a:)		ASPÁRTICO	CISTEÍNA	VALINA	ALANINA
Fresco (Sin mut:35)	C 12	11	8	0	3	0
	C 13	4	4	—	—	—
	C12/C12	1	0	0	1	1
Parafina (Sin mut:28)	C 12	9	4	2	2	1
	C 13	11	11	—	—	—
	C12/C12	1	0	0	1	1
	C12/C13	1	1	1	0	0

\* - Mutación no analizada.

### 3.3 Integración entre los datos genéticos y clínicos.

#### 3.3.1 Relación entre características de los tumores y la presencia de mutaciones.

Los pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo a su edad (pacientes menores y mayores de 40 años), observándose que el mayor número de tumores se presentaba en los pacientes mayores de 40 años. Se realizó una prueba de chi-cuadrada para ver si existía diferencia entre los pacientes que presentaban mutaciones y los que no, dando como resultado que el porcentaje de pacientes que presentaban la mutación en ambos grupos era muy parecida con una  $p=0.33$  y un  $RR=1.98$  (0.58-7.02), El total de mutaciones se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10. Mutaciones encontradas por grupos de edad.**

Pacientes	#	Mutación presente	Mutación ausente
< 40 años	19	7 (37%)	12 (63%)
> 40 años	82	31 (38%)	51 (62%)

\* $p=0.33$

Basándonos en la localización anatómica de los tumores y ya que esta neoplasia es más frecuente en el colon izquierdo (el cuál incluye colon descendente y recto), dividimos los tumores en aquellos localizados en colon derecho (Colon ascendente y colon transversal) y aquellos localizados en el

colon izquierdo. El total de mutaciones y su distribución anatómica se muestra en la tabla 11.

**Tabla 11. Mutaciones encontradas según la localización anatómica de las neoplasias.**

Neoplasias	#	Mutación presente	Mutación ausente
Colon izquierdo	21	5 (24%)	16 (76%)
Colon derecho	70	29 (41%)	41 (59%)
Localización desconocida	10	4 (40%)	6 (60%)

También se estudió la presencia y ausencia de mutaciones en los adenomas versus los adenocarcinomas, encontrando que la frecuencia de las mutaciones es mucho mayor en los adenomas (67%) que en los adenocarcinomas (27%), siendo estadísticamente significativa con una  $p=0.0001$ ; esto aún y cuando es mucho mayor el número de adenocarcinomas. El total de mutaciones se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12. Mutaciones encontradas en adenomas - vs - Adenocarcinomas**

Neoplasias	#	Mutación presente	Mutación ausente
Adenomas	33	22 (67%)	11 (33%)
Adenocarcinomas	59	16 (27%)	43 (73%)

\* $p=0.0001$

Otro análisis que se efectuó fue el de clasificar los adenomas en tipo tubular, vellosos y mixtos, recolectando un mayor número de adenomas mixtos. Al realizar una prueba de chi-cuadrada para observar si había diferencia significativa en la presencia de mutaciones entre los tres grupos, ésta fue

significativa, con una  $p=0.041$ , observándose que los adenomas vellosos presentan mayor número de mutaciones. Los datos se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13. Mutaciones encontradas en adenomas según su histología.**

Adenomas	#	Mutación presente	Mutación ausente
Tubular	9	3 (33%)	6 (67%)
Velloso	7	6 (86%)	1 (14%)
Mixto	17	13 (76%)	4 (24%)

\*  $p=0.041$

Dividimos a los adenocarcinomas según su grado de diferenciación en poco, moderadamente y bien diferenciado, no encontrando diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos. En la tabla 14 se muestran las mutaciones.

**Tabla 14. Mutaciones encontradas en los adenocarcinomas según su grado de diferenciación.**

Adenocarcinomas	#	Mutación presente	Mutación ausente
Poco diferenciados	14	2 (14%)	12 (86%)
Moderadamente diferenciados	37	12 (32%)	25 (68%)
Bien diferenciados	7	2 (29%)	5 (71%)
Localización desconocida	1	0 (0%)	1 (100%)

\*  $p=0.0432$

Luego dividimos a los adenocarcinomas según su grado de invasión, clasificándolos en los de estadio temprano (Duke A y B) y en estadio tardío (Duke C y D). Para saber si existía diferencia entre la presencia y ausencia de mutaciones, según el estadio, también procedimos a un análisis estadístico.

por medio de la prueba de chi-cuadrada, no observándose diferencia significativa con una  $p=0.7$ . El total de mutaciones se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15. Mutaciones encontradas en adenocarcinomas según la clasificación de Duke.**

Adenocarcinomas	#	Mutación presente	Mutación ausente
Estadio temprano (A y B)	43	13 (30%)	30 (70%)
Estadio tardío (C y D)	10	2 (20%)	8 (80%)
Localización desconocida	6	1 (17%)	5 (83%)

\*  $p=0.7$



## **CAPITULO 4**

### **DISCUSIÓN**

En México no se conoce la cifra exacta de pacientes con neoplasias colorrectales ya que las estadísticas no son muy confiables, pero se ha visto que la incidencia de esta enfermedad se ha ido incrementado en los últimos años.

Debido a que el mayor número de muestras se recolectaron en el Hospital Universitario Dr. "Dr. J. Eleuterio González de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y en el Hospital de Especialidades No. 25 del Centro Médico del Noreste Siglo XXI del IMSS, y dado que ambos hospitales son hospitales regionales, podemos decir que las muestras recolectadas son representativas de la región. Del total de muestras recolectadas (101) encontramos una predominancia para el sexo masculino, abarcando el 63.4% de las muestras mientras que el sexo femenino comprendió el 36.6% restante.

La edad en que oscila la presencia de esta neoplasia de acuerdo al sexo vá desde los 17 hasta los 87 años para las mujeres, y de 7 hasta los 92 años para los varones.

En cuanto a la porción anatómica más afectada, el 64.3% de los tumores provinieron del colon, mientras que el recto presentó tumores en el 35.7% de los pacientes.

Estandarizamos la técnica de PCR seguida por cortes con enzimas de restricción diagnósticas la cual nos permitió detectar casi el todas las mutaciones, ya que sólo dos muestras se tuvieron que secuenciar.

En cuanto al diagnóstico histopatológico más frecuente, fue el de adenocarcinoma, al cual le correspondió el 58.4% del total de diagnósticos,

siendo de nuevo mayormente afectado el colon. Para los adenomas correspondió el 28.7%, también siendo mayormente afectado el colon. Y por último, el 12.9% restante lo abarcó el diagnóstico de pólipo benigno afectando principalmente al colon; de estos 13 pólipos, 8 son hiperplásicos, los cuales son considerados como pólipos con un alto potencial de malignidad.

Quizá con todos estos datos no podamos hacer que las estadísticas de nuestro país sean más confiables, pero al menos nos podemos dar una idea de lo que sucede en nuestra localidad y extrapolar nuestros hallazgos a la región.

En cuanto al análisis molecular, los resultados nos arrojan que existe un 38% de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen k-ras. Esto concuerda con estudios anteriores que autores como Bos y cols. (12) y Vogelstein y cols. (14) habían realizado ya, en los cuales las mutaciones en el gen k-ras ocurren en alrededor de un tercio de las neoplasias colorrectales, incluyendo el codón 61 (1% de las mutaciones). Delattre y cols.(16), Scott y cols. (29) y Forrester y cols.(13) reportaron que las mutaciones puntuales del oncogen K-ras ocurren en un 40% de los casos en CCR. Estos resultados difieren un poco de lo descrito por Moerkak y cols., ya que ellos reportan un 53% de mutaciones en el oncogen k-ras, incluyendo al codón 61 (1.3% de las mutaciones). Del 38% de mutaciones encontradas por nosotros un 53% corresponden a mutaciones en el codón 12, siendo nuestro hallazgo diferente a lo descrito en la literatura, donde existe una alta incidencia de mutaciones en el codón 12 (13,21). La mutación más frecuentemente encontrada fue la sustitución de glicina por aspártico en el codón 13, seguida por la de aspártico en el codón 12. Aquí nuestros resultados difieren a lo descrito anteriormente ya que la mutación más frecuente en otros estudios es la de aspártico en el codón 12 (13, 27).

No se encontró una correlación aparente entre la presencia de mutaciones en *K-ras* y la edad de los pacientes, localización anatómica de las neoplasias y el grado de invasión del tumor. Pero se encontró que la presencia de mutaciones en adenomas es mucho mayor que en carcinomas. Esto concuerda con la mayoría de los laboratorios que investigan la genética molecular del CCR, pues éstos están de acuerdo de que las mutaciones en

Ras son menos frecuentes en los carcinomas que en los adenomas (14,27 y 28). Con esto también corroboramos que no todos los adenomas se transforman en adenocarcinomas, ya que se cree que los adenomas que presentan mutaciones en *K-ras* tienen un mejor pronóstico, debido a que se piensa que *K-ras* no está involucrado en la malignidad del tumor, sino más bien en el crecimiento de los adenomas(27, 28).

También se encontró diferencia significativa entre la presencia de mutaciones y las diferentes clases de adenomas (tubular, veloso y mixto), encontrándose mayor número de mutaciones en el velosos (6 de 7), lo que se asemeja a lo encontrado por Forrester y cols., quienes reportaron 7 de 8 adenomas velosos (13).

En el tejido de transición se encontró un 23% de mutaciones semejante a lo anteriormente reportado (27). De las 5 mutaciones encontradas 4 mutaciones fueron las mismas presentes en los tumores, por lo que suponemos que estas mutaciones provienen de la misma línea celular mutada y éstas pueden detectarse en tejido aparentemente normal por histología. El otro paciente que presentó mutación en el tejido de transición y esta se detectó por secuenciación su tejido normal no presentó ninguna mutación La otra mutación fue la detectada por secuenciación y en ésta el tejido tumoral no presentaba ninguna mutación, lo que nos hace suponer que esta mutación es una nueva mutación iniciada por otro proceso diferente al que propició el tumor.

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

Los hallazgos del presente trabajo, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se estableció un banco de DNA genómico de pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales.
2. Se implementó la técnica de RFLP's para la detección de mutaciones presentes en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras.
3. Se infirió a través del análisis de una muestra de nuestra población local la frecuencia y tipo de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen k-ras en neoplasias epiteliales colorrectales.
4. La frecuencia de mutaciones encontrada en la muestra de nuestra población es muy semejante a lo reportado con anterioridad en poblaciones sajona y japonesa.

## **CAPITULO 6**

### **PERSPECTIVAS**

Analizando el trabajo en su conjunto, sus hallazgos, alcances y sus contribuciones tanto metodológicas como de carácter epidemiológico a nivel molecular, podemos plantear las siguientes perspectivas:

- 1. El contar con el banco de DNA genómico de los pacientes nos permitirá ampliar el estudio a otros genes involucrados en la etiología de neoplasias epiteliales colorrectales, con la idea de valorar la utilidad que cada uno de estos marcadores puede aportar a la detección oportuna de estas neoplasias.**
- 2. Conociendo el perfil de mutaciones de los distintos marcadores en nuestra población, y ya que existen reportes de detección de mutaciones en el oncogen k-ras en muestras de heces, podría utilizarse este método como una prueba de detección oportunas no invasiva.**

## REFERENCIAS

1. Shike M. et al. Bull. WHO 68:377 (1990). Beart R. et al. in Textbook of Clinical Oncology, Murphy Eds. (American Cancer Society), Atlanta, 1991, 213-18.
2. Twelve Major cancers. Scientific American. September 1996,92-98.
3. de la Chapelle A., Peltomaki P. Genetics of hereditary colon cancer. Annu. Rev. Genet. Vol 29, 1995. 329-48.
4. Weinberg RA. Molecular Mechanisms of Carcinogenesis. Scientific American. Introduction to Molecular Medicine. Edited by Philip Leder, David A Clayton, Edward Rubinstein. Scientific American Inc., New York. 1994. Cap. 10,253-276.
5. Rich T, Gunderson LL, Galdabin J et. al. More than 90% of patients with adenomas or with carcinomas confined to the mucosa can be cured by surgical methods. Cancer Vol 52, 1993. 1317.
6. Ransohoff DF and Lang CA, New Engl J Med 325, 37 (1991); De Cosse JJ and Jacobson JS, ibid. 326,134 (1991); Cooper JN, O'Connor K, Winamer SJ ibid. p.136.
7. Eddy DM. Gastroenterology 92, 682 (1987), Eddy DM, Ann Intern Med 113, 373 (1990), Miller AB. Int J Cancer 46, 761 (1990).
8. Yanez, L.; Groffen, J.; Valenzuela, DM. c-K-ras mutations in human carcinomas occur preferentially in codon 12. Oncogene 1: 315-318, 1987. MEDLINE UID : 88262222

9. Krengel U, Schlitching >L, Scerzer A, et al. Three dimensional structures of H-ras: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* Vol 62, 1990. 539.
10. Popescu, N. C.; Amsbaugh, S. C.; DiPaolo, J. A.; Tronick, S.R.; Aaronson, S. A.; Swan, D.C. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat. Cell Molec. Genet.* 11, 149-155, 1985. MEDLINE UID : 85168524
11. O'Connell P, Leppert M., Hoff M, Kumlin E, Thomas W, Cai G, Law M, White R. A linkage map for human chromosome 12. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 37, 1985 A169 only.
12. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* Vol. 327. 1987. 293-297.
13. Forrester K. Almoguera C. Han K, Grizzle WE. Detection or high incidence of k-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* vol. 327, 1987, 298-303.
14. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Eng. J.* 1988
15. Burmer GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86:2403-2407, 1989. MEDLINE UID : 89184635
16. Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Rémvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP, Thomas G. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* II: 353-356, 1989.
17. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.

18. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of RAS oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256: 102-105, 1992.
  
19. Takeda S, Ichii S, Nakamura Y. Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum. Mutat.* 2: 112-117, 1993. MEDLINE UID : 93306303
  
20. Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K. Detection of K-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* Vol, 1995. 1441-1445.
  
21. Ranaldi R, Gioacchini AM, Manzin A, Clementi M, Paolucci S, Bearzi I. Adenoma Carcinoma Sequence of Colorectum. *Diagnostic Molecular Biology* Vol 4 (3), 1995. 198-202.
  
22. Susan E. Goetz, Stanley R, Hamilton, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochemical and biophysical research communications* Vol 130. 1995. 118-126.
  
23. Shibata D., Almoguera C., Furrecter J., Dunitz J., Martin S.E., Cosgrove M., Perucho M. and Arnheim N. Detection of mutational activation of the c-K-ras gene in human pancreatic adenocarcinoma. *Balliere Clin. Gastroenterol.* 4:151-169 (1990).
  
24. Khorana S., Gagel RF., Cote GJ. Direct Sequencing of PCR products in agarose gel slices. *Nucleic Acids Res.* 1994, Aug 25;22(16): 3425-6.
  
25. Barrera Saldaña H.A., Oetíz López R., Rojas Martínez A., Reséndez Pérez D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. *Ciencia y Desarrollo*: 50-60.



26. Kumar R., Dunn LL. Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutation in ras oncogenes. *Oncogene Res.* 1989, 4(3):235-241.
27. Toshinari Minamoto, Naoyuki Yamashita, Atsuchi Ochiai, Masayoshi Mai, Takashi Sugimura, Zeev Ronai and Hiroyasu Esumi. 1995. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. *Cancer supplement: 75*, 1520-1526.
28. Benhattar Jean, Losi Lorena, Chaubert Pascal, Givel Jean-Claude, and Costa Jose. 1993. Prognostic Significance of *K-ras* mutations in Colorectal Carcinoma. *Gastroenterology: 104*,1044-1048.
29. Kahn Scott M., Jiang Wei and Weinstein Bernard. 1990. Rapid nonradioactive Detection of ras Oncogenes in Human Tumors. *Amplifications: 4*,22-26.

## ANEXO

Número de muestra \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

### Datos generales

Hospital \_\_\_\_\_ 1.H.U. 2.Metro. 3.Muguerza. 4.Sn. José. 5.Otros (especificar)

Servicio \_\_\_\_\_ 1.Gastroenterología 2.Cirugía 3.Patología 4.Otros.

No. de registro \_\_\_\_\_ No. de expediente \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Estado civil \_\_\_\_\_ 1.Soltero, 2.Casado, 3. Viudo, 4.Unión libre

Ocupación \_\_\_\_\_ Escolaridad \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

### Patología crónica no neoplásica \_\_\_\_\_

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1.Diabetes                  | 5.Cardiopatía isquémica     |
| 2.Hipertensión arterial     | 6.Infecciones (especificar) |
| 3.Obesidad                  | 7. otras (especificar)      |
| 4.Autoinmunes (especificar) |                             |

### Patología previa neoplásica, benigna y maligna

	Sitio	Diagnóstico	Fecha
1.	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____

### Patología previa intestinal \_\_\_\_\_ Duración (años) \_\_\_\_\_

- |                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| 1. Estreñimiento crónico | 4. Ileitis             |
| 2. Colon irritable       | 5. Otros (especificar) |
| 3. CUCI                  |                        |





## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**Sandra Guadalupe Martínez Garza**

Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias  
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis:

**DETECCIÓN DE MUTACIONES EL ONCOGEN K-ras EN  
NEOPLASIAS EPITELIALES COLORRECTALES**

Campo de estudio:

Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Cd. Mante, Tamaulipas el 30 de enero de 1973, hija de Joel Martínez Hernández y Eloisa Garza de Martínez.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 1996.



