

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA FRECUENCIA
DE MUTACIONES EN EL GEN SUPRESOR
DE TUMORES p53 EN NEOPLASIAS
EPITELIALES COLORRECTALES

POR:

Q.C.B. ALMA ROSA CRUZ CABRERA

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

Monterrey, N. L.

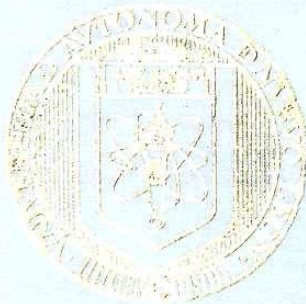
Julio, 2002

TM
RC280
.C6
C7
2002
c.1



1080116292

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA
DE MUTACIONES EN EL GEN SUPRESOR
DE TUMORES p53 EN NEOPLASIAS
EPITELIALES GASTROINTESTINALES

POR:

Q.C.B. ALMA ROSA CRUZ CABRERA

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

Monterrey, N. L.
Julio, 2002

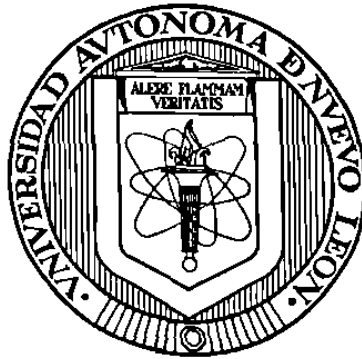


TM
RC280
-CC
C7
2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIONES
EN EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53 EN NEOPLASIAS
EPITELIALES COLORRECTALES**

Por

Q.C.B. ALMA ROSA CRUZ CABRERA

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

Monterrey, N.L.

Julio, 2002

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y la Co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN
SUPRESOR DE TUMORES p53 EN NEOPLASIAS EPITELIALES
COLORRECTALES**

Aprobación de la Tesis:



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis




DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A DIOS

Por la vida que me ha dado

A MIS PADRES

Por su amor, por estar conmigo

A MI HIJA

Dinorah con todo mi amor, gracias por su compañía, comprensión y paciencia

A MIS HERMANOS

Ma. Antonieta, Irma, Conchis (por su valiosa ayuda por el cuidado y atención con mi hija), Laura, Claudio, Teresa, Luisa y Martha por ser una familia unida.

A TODOS MIS SOBRINOS

AGRADECIMIENTOS

Dr. Hugo A. Barrera por haberme aceptado en su especialidad, su apoyo y sus comentarios para la elaboración de este trabajo.

Dra. Rocío Ortiz López y Dr. Augusto Rojas por su asesoría, sugerencias en la elaboración de este trabajo.

Dra. Herminia G. Martínez por sus enseñanzas, amistad, sugerencias para este trabajo

Dra. Agnés Revol por su apoyo en la lectura de secuenciación de muestras, y por su asesoría.

A mis compañeros de generación a Lucia Yareli y Luis Alejandro por los momentos que compartimos juntos.

A mis compañeros de la ULIEG

M.C. Sandra Martínez por compartir conmigo sus conocimientos, así como su apoyo y amistad, a mis compañeros de laboratorio Irma Martínez, Iván y Dr. Pablo Flores. M.C. Dolores Carmen Esquivel por su apoyo en la realización de la secuenciación en este trabajo. Celia, Iram, Carmen Margarita, Raúl, Elsa, Vicki, Raquel, Alejandra, Mónica, Irazema, Sonia

Al CONACYT por la beca otorgada.

RESUMEN

Alma Rosa Cruz Cabrera
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de graduación: Julio del 2002

Título del estudio: Determinación de la frecuencia de mutaciones en el gen supresor de tumores p53 en neoplasias epiteliales colorrectales en el noreste de México.

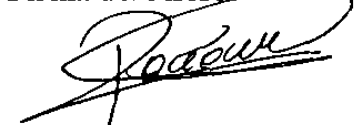
Número de páginas: 54 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de Estudio: Genética Molecular

Propósito y Método de estudio: El cáncer colorrectal (CCR) es la neoplasia más frecuente del tracto gastrointestinal. En Estados Unidos ocupa el 2º lugar de frecuencia después de cáncer de pulmón y es una enfermedad que afecta por igual a hombres y mujeres por arriba de los 50 años. El CCR se presenta mayoritariamente en forma esporádica y solo un 10% de los casos lo hacen en forma hereditaria. Esta neoplasia progresa a través de una serie de etapas clínicas e histológicas, las cuales resultan de una serie de cambios genéticos que implica la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. p53 es un gen supresor de tumores y es considerado como el factor determinante involucrado en la malignidad, ya que al inactivarse descontrola el ciclo celular, siendo capaz de transformar un adenoma a carcinoma. El propósito de esta investigación fue estudiar mutaciones en los principales exones del gen p53 en muestras de neoplasias colorrectales, para lo cual se procedió a: 1) estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen. 2) implementar la técnica SSCP para identificar regiones exónicas con posibles mutaciones, 3) secuenciar las bandas anormales observadas en la técnica de SSCP. Y 4) correlacionar los datos moleculares encontrados con el diagnóstico histológico de la neoplasia.

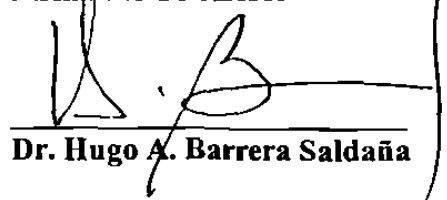
Contribuciones y conclusiones: La técnica de SSCP y la secuenciación nos permitieron detectar un 11.11% de mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53. Esta frecuencia es más baja que la reportada para otras poblaciones. Todas las mutaciones encontradas provinieron de pacientes con adenocarcinomas, no encontrándose alteraciones genéticas en pólipos no neoplásicos, ni en adenomas. Nuestro trabajo coincide con lo previamente descrito, observándose que p53 es un gen que se altera en etapas finales de la evolución de dicho cáncer.

Firma del Asesor



Dra. Rocío Ortiz López

Firma del Co-Asesor



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 El Cáncer : un grave problema de salud	1
1.2 Cáncer colorrectal	2
1.3 Alteraciones genéticas encontradas en el CCR	4
1.4 El CCR como modelo para el cáncer	5
1.5 El Gen supresor de tumor p53	8
1.6 Funciones de p53	10
1.7 Mecanismos de inactivación de p53: frecuencias y efectos de sus mutaciones	11
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODO	
3.1 Equipo	15
3.2 Reactivos	16
3.3 Materiales	17
3.4 Material Biológico: Pacientes y Controles	17
3.4 Criterios de Inclusión	17
3.4.2 Muestras de Tejido Fresco	18
3.4.3 Muestras de Sangre Periférica	18
3.5 Estrategia General	18
3.6 Métodos	19
3.6.1 Extracción de DNA	20
3.6.2 Electroforesis en gel de agarosa	21
3.6.3 Implementación de la técnica de PCR para amplificar los exones 5,6,7 y 8 del Gen p53	23
3.6.4 Estandarización de la técnica SSCP	26
3.6.4.1 Preparación del gel de poliacrilamida al 6%	29
3.6.4.2 Obtención de las bandas anormales del gel de poliacrilamida	30
3.6.4.3 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa	30
3.6.5 Secuenciación (determinación de la secuencia nucleotídica) de los productos amplificados.	31

4. RESULTADOS	
4.1 Datos clínicos patológicos	33
4.2 Datos de genética molecular	34
4.2.1 Construcción del banco de DNA Genómico	34
4.2.2 Amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53	35
4.2.3 Análisis de los productos amplificados por SSCP	36
4.3 Diagnóstico por secuenciación	38
4.3.1 Mutaciones encontradas	40
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	45
7. PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFÍA	47
APÉNDICE I	53
APÉNDICE II	57

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1	Frecuencia de mutaciones del gen p53	13
Tabla 2	Descripción de la secuencia de los iniciadores	25
Tabla 3	Condiciones para la PCR	25
Tabla 4	Condiciones del programa del termociclador	26
Tabla 5	Reactivos para la preparación del gel de poliacrilamida	29
Tabla 6	Distribución de los pacientes por sus edades	32
Tabla 7	Subclasificación de los adenomas y adenocarcinomas	33
Tabla 8	Resultados de los SSCP	37
Tabla 9	Resultados obtenidos en la secuenciación	40
Tabla 10	Frecuencia de mutaciones en p53 por estadio histopatológico	40

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Fig.1	Esquema del modelo de evolución del cáncer colorrectal	7
Fig.2	Organización de la proteína p53	9
Fig.3	Diferentes dominios son responsables de las funciones de la proteína p53	10
Fig.4	Papel de p53	12
Fig.5	Metodología	19
Fig.6	Esquema que representa dos ciclos de la PCR	24
Fig.7	Esquemmatización de la técnica SSCP	28
Fig.8	Análisis de DNAs	34
Fig.9	Análisis electroforético de los productos generados por la PCR	35
Figs.10 y 11	Detección de mutaciones por la técnica SSCP	36
Fig. 12	Imágenes de la secuencia nucleotídica del exón 5	38
Fig. 13	Alineamiento de la secuencia nucleotídica en geles de acrilamida	39

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
CCR	Cáncer colorrectal
Cols.	Colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato de desoxiribonucleósidos
EDTA	Ácido etiléndiaminotetracético
g	Gramos
Fig.	Figura
°C	Grados centígrados
kD	Kilodaltons
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
n	Tamaño de la muestra
ng	nanogramos
NaCl	Cloruro de sodio
p	Brazo corto de un cromosoma
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Seg.	Segundos
TBE	Trizma base, ácido bórico y EDTA
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TSNT	Tritón, SDS, NaCl y EDTA
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Vol.	Volumen
X	Veces la concentración de una solución de trabajo

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 EL 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 coordinación 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 una enfermedad genética, cuya manifestación inicia a partir de una única célula (clonal). Aunque existen algunos tipos de cánceres hereditarios, la gran mayoría (90%) se clasifican de naturaleza esporádica. Las mutaciones en estos cánceres se presentan en células somáticas y son producidas por errores intrínsecos de la replicación del DNA o son provocadas por exposición a carcinógenos.

En México y en Estados Unidos, el cáncer es la segunda causa más común de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. 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 CÁNCER COLORRECTAL

El CCR ocupa la segunda causa en frecuencia de mortalidad por cáncer en Estados Unidos, siendo superado solo por el de pulmón (1). La incidencia de este cáncer varía en forma amplia, siendo mayor en países industrializados como en Estados Unidos, Europa Occidental y Australia y mucho menor en países en desarrollo (3).

Aproximadamente una de cada 10,000 americanos, ingleses ó japoneses son afectados por la enfermedad denominada poliposis adenomatosa familiar (FAP, por sus siglas en inglés). FAP es una condición autosómica dominante que inicialmente se manifiesta por la formación de cientos de pólipos colorrectales benignos, de los cuales eventualmente, algunos progresan a malignidad, denominándose entonces: cáncer de colon y recto ó cáncer colorrectal (CCR). Esta enfermedad afecta por igual a hombres y mujeres y su detección temprana permite un mejoramiento sustancial de su evolución.

En México, el CCR ocupa el onceavo lugar en mortalidad dentro de las neoplasias malignas (4). La mortalidad en 1998 en México fue de 3.2 en varones y 3.1 en mujeres por 100,000 habitantes (5).

Se ha observado que algunos factores contribuyen a la patogenia de esta enfermedad, como por ejemplo, la ingestión de carne roja. Esta se ha correlacionado con un riesgo incrementado de CCR debido a que las grasas animales originan un aumento en la proporción de anaerobios en la microflora intestinal, causando la transformación de los ácidos biliares normales en carcinógenos (3). Otra observación es la que se ha hecho en la tribu de los bantúes de África. Esta tribu ingieren una dieta muy rica en fibra que produce heces voluminosas y frecuentes, y tiene una incidencia más baja de CCR que los americanos y europeos. Estas observaciones han llevado a proponer que la tasa más alta de CCR en la sociedad occidental se debe en gran parte al bajo consumo de fibra en la dieta, ya que la fibra dietética protege contra los pólipos y el cáncer invasor de colon. Los mecanismos implicados son complejos e imprecisos, incluyéndose entre los beneficios una disminución del tiempo para el tránsito intestinal, lo que reduce la exposición de la mucosa colónica a posibles carcinógenos (3).

Estos y muchos otros estudios epidemiológicos implican claramente a la dieta como factor principal del CCR, pudiéndose incluir entre otros factores la inactividad física, la exposición a ciertos químicos y aquellos individuos que poseen antecedentes de colitis

crónica y pólipos intestinales. Sin embargo, no se debe olvidar que el componente genético (y los antecedentes familiares) tiene un peso muy importante en esta afección (3).

1.3 ALTERACIONES GENÉTICAS ENCONTRADAS EN EL CCR

Se sabe que el cáncer es la consecuencia de una serie de alteraciones genéticas que progresivamente interrumpen el mecanismo normal que controla la proliferación celular y estas evidencias han sido muy bien establecidas en el CCR (6). De manera que el CCR se ha tomado como un modelo para ejemplificar los eventos secuenciales que ocurren en el cáncer. Se ha logrado el análisis de los eventos moleculares claves que tienen lugar en éste, pues a diferencia de otros tipos de cáncer, en el CCR fue posible obtener muestras en diferentes estadios de la enfermedad para hacer el análisis y la caracterización molecular, así como correlaciones con los estadios histopatológicos. De acuerdo al mismo, el CCR evoluciona a través de una serie de formas histopatológicas, comenzando con áreas displásicas y pasando a través de un estado de pólipos adenomatosos (tumores benignos) de diferentes tamaños, para finalmente progresar a un carcinoma no invasor y luego al carcinoma metastásico. Los pacientes con la enfermedad avanzada tienen un pobre pronóstico, tomando como evidencia el hecho de que el 40% de pacientes con CCR muere por la enfermedad dentro de los 5 años después del diagnóstico. Sin embargo, los tumores diagnosticados en un estadio temprano pueden ser curados por escisión colonoscópica o quirúrgica (7).

Las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer consisten en la activación de *proto-oncogenes*, *daño de los genes reparadores del DNA* o *la inactivación de genes supresores de tumores*. Las técnicas de biología molecular 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. Las mutaciones en éstos aparecen como resultado de procesos endógenos y exógenos, así como por la exposición a carcinógenos físicos y químicos del ambiente. Los procesos endógenos incluyen *la metilación de citosina*, cuando se genera la forma 5-metilcitosina que posteriormente se desamina y consecuentemente se convierte a uracilo, común en las regiones ricas en los dinucleótidos en CpG, el *daño por radicales libres* generados por procesos biológicos y *errores en la reparación del DNA* (8).

Está bien documentado que los genes supresores de tumores pueden ser inactivados por mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, etc. Dichas mutaciones participan en la transformación neoplásica, ya que la función de los productos de los genes supresores de tumores es bloquear el crecimiento anormal y la transformación maligna (7). Los genes supresores de tumores son recesivos, es decir para permitir la transformación maligna ambas copias del gen deben sufrir mutaciones, ésto en contraste con los oncogenes, en los cuales, dada su dominancia, requieren solo de la mutación en una copia (10).

1.4 EL CCR: como modelo para el cáncer.

En 1990, Vogelstein y cols. estudiaron a nivel molecular la participación de las alteraciones genéticas encontradas en CCR: mutaciones en el protooncogen Ras y deleciones en genes localizados 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) y mutaciones en el gen p53 en etapas tardías.

En adenomas mayores de 1 cm de tamaño, la prevalencia fue similar a la observada en carcinomas (58% y 47%, respectivamente). Algunos marcadores moleculares del cromosoma 5 que están ligados a poliposis adenomatosa familiar rara vez estuvieron ausentes en adenomas de dichos pacientes, y el ligamiento que asociaba los marcadores moleculares del cromosoma 18 con adenomas intermedios, se perdía frecuentemente cuando se trataba de carcinomas de colon (73%). Estos resultados inspiraron la postulación del modelo molecular donde los pasos requeridos para la malignidad involucran la activación de oncogenes a la par con la pérdida de diversos genes que normalmente suprimen la tumorigénesis (7).

En 1990, Fearon y Vogelstein (6) establecieron el primer modelo genético de la evolución del cáncer de colon, el cual fue posteriormente actualizado por Kinzler y Vogelstein (7).

El modelo sugiere 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 (9,11). Los genes blanco para estas mutaciones incluyen el gen APC (de Adenomatous polyposis coli) en el cromosoma 5 en el inicio del proceso, mientras que la progresión tumoral resulta de las mutaciones en otros genes; a saber: K-ras en el cromosoma 12, p53 en 17p, y DCC (Deleted in colorectal carcinoma) en el cromosoma 18 (Ver Figura 1).

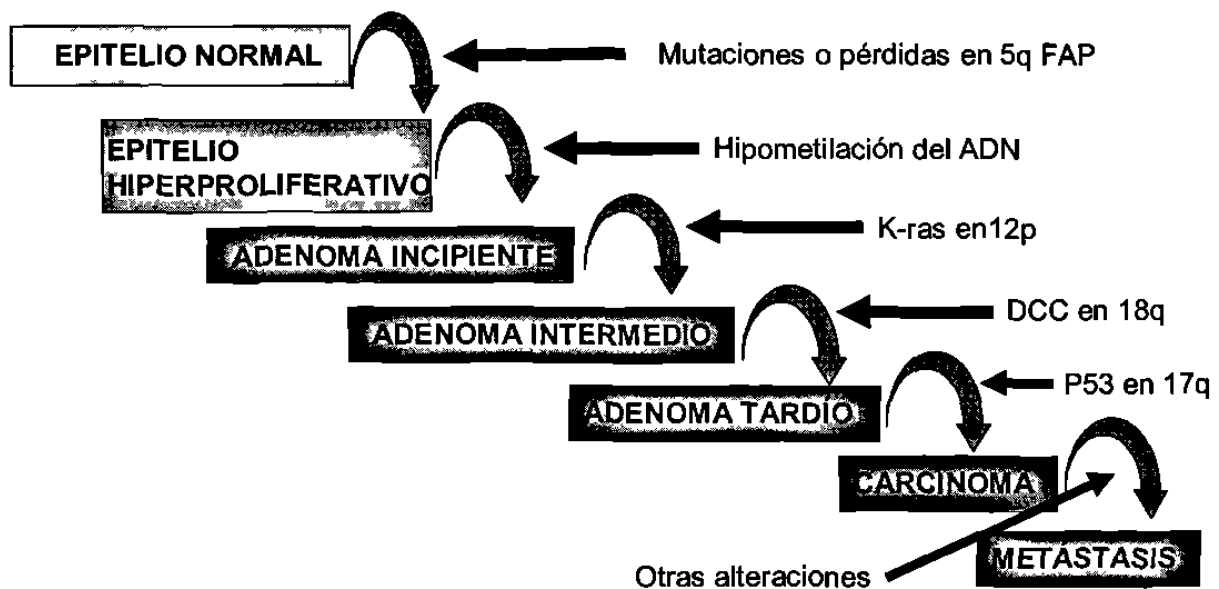


Figura 1. Modelo de evolución del CCR. Se ilustran los diferentes eventos mutagénicos que pueden participar en la generación del CCR. *Modificado a partir de Vogelstein (12).*

En total, son 6 ó 7 los genes involucrados en forma parcial. El orden preciso de los cambios parece que no resulta tan importante como la acumulación de los mismos. Mutaciones adicionales son necesarias para que se desencadenen la diseminación y la metástasis.

En otros padecimientos malignos el espectro de oncogenes y genes supresores de tumores implicados, posiblemente difiere de este modelo (13). Debido a que en este trabajo nos enfocamos al análisis del gen p53, a continuación haremos una descripción un poco más detallada de este gen y su proteína, así como de algunas de sus funciones e interacciones con otras proteínas.

1.5 EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53.

El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 13.1 y está compuesto de 11 exones dentro de un dominio cromosómico de 20 kb. El segundo exón contiene el codón de inicio de la traducción. El transcrito primario es procesado para producir un RNAm de 2.2 y 2.5 kb, siendo sintetizado en todas las células del cuerpo, aunque el timo, bazo, testículos y ovario, tienen las más altas concentraciones de este mensajero (14).

El gen p53 se encuentra conservado a lo largo de la escala evolutiva, y la secuenciación de la proteína en diferentes especies de mamíferos, anfibios, aves y peces estableció que existen cinco regiones altamente conservadas, denominadas como *Regiones I, II, III, IV, V*. La conservación de la secuencia de aa correspondientes a estas regiones es de hasta un 100% entre diferentes especies. Las regiones I a V corresponden a los codones 17-29, 114-138, 166-179, 227-253, y 264-280, entre los exones 5, 6, 7 y 8, respectivamente, los cuales resultan ser los más frecuentemente mutados en diferentes

neoplasias, entre los que sobresalen: las argininas en las posiciones 175, 248 y 273 de la proteína, que al estar mutados se ha visto que el cáncer es más agresivo (Ver Fig. 2) (8,14).

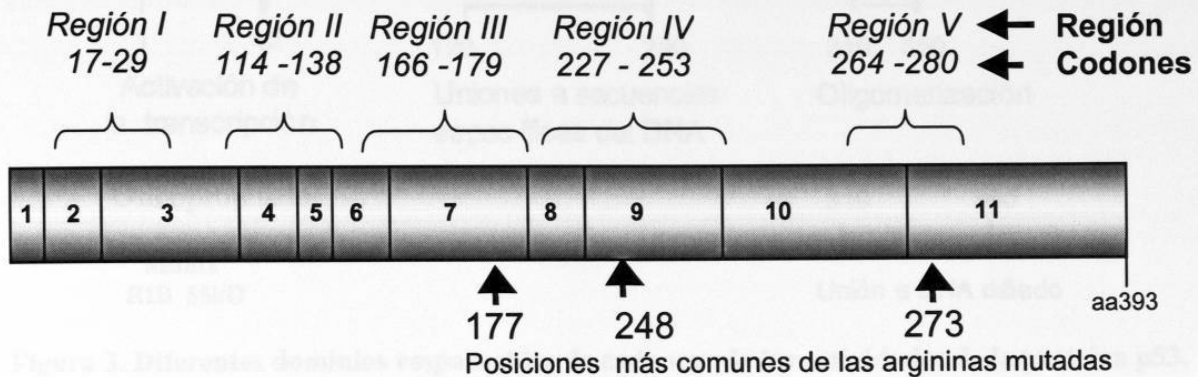


Figura 2. Organización de la proteína p53. La secuencia codificante contiene 11 exones, y se distinguen 5 regiones altamente conservadas entre las especies las cuales están enumeradas como I, II, III, IV y V. Las flechas indican la posición de los residuos de arginina más frecuentemente mutados (8,15).

El producto de este gen es una fosfoproteína que consta de 393 residuos aminoacídicos (aa), de localización nuclear, que migra en un gel como una proteína de 53 kd, de ahí se deriva su nombre (10).

La proteína p53 tiene varias funciones debido a que posee tres dominios a lo largo de su estructura. 1) *Un dominio amino-terminal*, el cual funciona como activador de la transcripción, regulando algunos genes que participan en la división celular, 2) El *dominio central*, el cual se une a secuencias específicas de DNA blanco, la secuencia nucleotídica consenso para unirse al DNA es (5'-Pu-Pu-Pu-C-A/T-A/T-G-Py-Py-Py-3') y 3) *el dominio carboxilo-terminal*, el cual es el responsable de la formación de tetrámeros de la proteína; p53 se une al DNA dañado a través de este último dominio, ya que reconoce regiones de DNA de una sola hebra. Además, posee múltiples sitios de fosforilación localizados en ambas regiones amino-y carboxilo-terminales (Ver Fig. 3) (15).

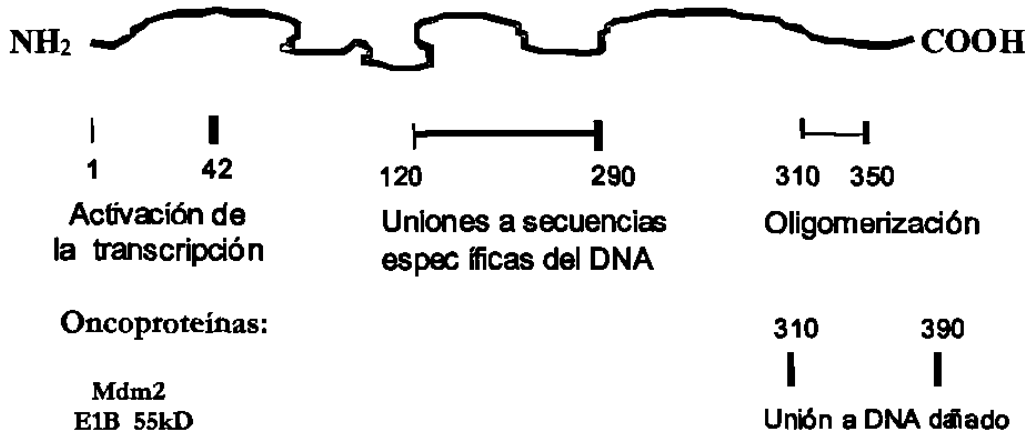


Figura 3. Diferentes dominios responsables de cada una de las actividades de la proteína p53. Se muestran los 3 dominios que posee la proteína p53 a lo largo de su estructura; el dominio amino-terminal, el dominio central y el dominio carboxilo-terminal; también se muestra como algunas oncoproteínas (TBP, mdm2 y E1B-55kd) producidas por oncogenes o algunos virus, se unen a estos dominios, inactivando la función normal de los mismos.(15)

1.6 FUNCIONES DE p 53

La proteína p53 tiene al menos 3 funciones:

- 1). Activa la transcripción de ciertos genes implicados en la división celular.
- 2). Actúa como un supervisor del control del daño al DNA durante G₁. Si surge un daño excesivo del DNA, por ejemplo después de exposición a radiación UV, aumenta la actividad de p53, lo que produce inhibición de la división celular y concede tiempo para la reparación. Si el ciclo celular dejara de ser vigilado, el daño en el DNA se replicaría, produciendo mutaciones permanentes en el genoma. Por otra parte, si p53 se inactiva como en muchos tumores, podría dejar de ejercer esta función, el daño al DNA se acumularía en la célula y ésta se volvería genéticamente menos estable. Por esto, se propone que p53 actúa como "guardián del genoma" o "policía molecular".

3). p53 participa en el inicio de la apoptosis, la cual se define como la muerte celular programada, controlada por eventos regulados por genes específicos que se presentan en muchos casos fisiológicos, como por ejemplo en el crecimiento embrionario y en el remodelado tisular. Las células que sufren apoptosis se encogen, su cromatina se condensa, se fragmenta su DNA y sus membranas presentan ámpulas (Ver fig. 4) (9).

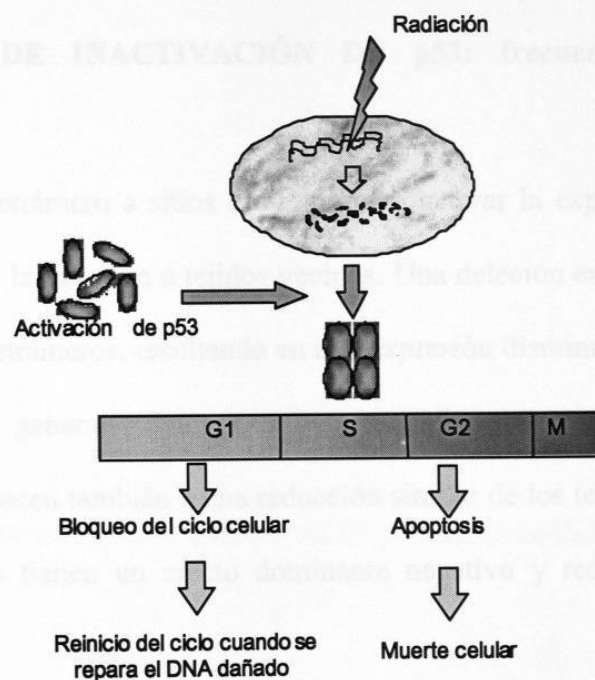


Figura 4. Papel de p53 en el ciclo celular. El ciclo celular consta de cuatro fases (G₁, S, G₂ y M) en los cuales la célula pasa a través de un número de puntos de control o de transición en los que la progresión a la siguiente etapa puede ser promovida o suspendida. Se indican las fases del ciclo celular donde actúa p53 (15).

La proteína p53 puede activar genes implicados en la apoptosis y reprimir los genes necesarios para que la célula sobreviva, o ser un integrante de las series bioquímicas de eventos que dan lugar a la apoptosis, ésto es con el propósito de acelerar la muerte de células dañadas genéticamente que pueden convertirse en malignas. En algunos casos sin embargo, la apoptosis es patológica, como en la muerte celular que se observa en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (9).

1.7 MECANISMOS DE INACTIVACIÓN DE p53: frecuencia y efectos de mutaciones.

p53 se une como tetrámero a sitios de unión para activar la expresión de genes que inhiben el crecimiento o la invasión a tejidos vecinos. Una delección en uno o ambos alelos reduce la expresión de tetrámeros, resultando en una expresión disminuida de dichos genes. Las mutaciones que generan una proteína truncada no permiten tampoco la oligomerización, y conducen también a una reducción similar de los tetrámeros de p53. Las mutaciones con sentido tienen un efecto dominante negativo y reducen los tetrámeros funcionalmente activos.

Se ha observado que en el cáncer de cervix, la expresión de E6 (proteína del virus del papiloma humano asociado a este cáncer) y niveles aumentados de la proteína MDM2 dan como resultado una inactivación de la función de p53. Los complejos MDM2-p53 probablemente se unen a otras proteínas, pero MDM2 inhibe la actividad transcripcional de p53 y E6 puede promover la degradación de p53 a través de proteólisis mediada por ubiquitina

Cuando se encuentran mutaciones en p53 se observa que pueden producirse alguno o todos los siguientes cambios: un incremento de su vida media de 20 min. a varias h, un cambio en su conformación que puede ser detectada con anticuerpos y cambios en su localización del núcleo al citoplasma (15).

La secuencia del gen p53 ha sido estudiada en varias poblaciones y se han reportado las mutaciones más frecuentes en pacientes con diagnóstico de neoplasias epiteliales colorrectales, encontrándose que los sitios más frecuentemente mutados son las regiones que abarcan los exones 5, 6, 7 y 8. Las mutaciones en los demás exones del gen son muy raras. Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia de las mutaciones de p53 en carcinomas colorrectales

Año	Autor	Porcentaje	Referencia
1990	Baker / Watson	70.0 %	16
1995	Goh	57.0 %	18
1997	Leung / Cheung	35.4 %	17
1998	Vogelstein / Kinzler	85.0 %	7
2000	Sugai / Nakamura	53.0 %	26

Sin duda, la inactivación del gen p53 juega un papel clave en la patogenia del CCR, sin embargo, en nuestra población no se conocen estudios sobre los tipos ni las frecuencias de las mutaciones de p53 presentes en los tumores colorrectales, por lo que estimamos de gran importancia iniciar con el tamizaje y caracterización de mutaciones en dicho gen, ya considerando que estos resultados permitirían auxiliar el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. Además, el establecimiento de metodologías moleculares para la búsqueda de mutaciones en el gen p53, permite aplicar éstas a una amplia gama de situaciones adicionales a las particulares de este trabajo.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la frecuencia de las mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53 en pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Realizar la extracción de DNA de tejido y a las muestras del banco de DNA de pacientes con neoplasias epiteliales colorrectales.
2. Implementar la técnica de PCR para amplificar los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53 a partir de todas las muestras, utilizando los primers previamente descritos por Chumakov (19).
3. Determinar la presencia de mutaciones en dichos exones mediante la técnica SSCP.
4. *Confirmar* la presencia de mutaciones puntuales, por la técnica de secuenciación de las bandas anormales del análisis por SSCP.
5. *Determinar* las frecuencias de las mutaciones del gen p53 en nuestra población, y compararlas con las reportadas en otras poblaciones.
6. *Correlacionar* las características de las neoplasias y la presencia de mutaciones.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EQUIPO

En el aislamiento de DNA se utilizó el siguiente equipo una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6, (Palo Alto, CA, USA) una microcentrífuga eppendorf 5415C Brinkman, (Westbury, NY USA) un vortex modelo 37600 Thermolyne, (Dubuque, Iowa, USA) una balanza granataria Sartorius 1206 MP (Cambh, Gottingen Alemania), para la cuantificación de DNA's de pacientes y controles, se utilizó un espectrofotómetro DU 70 Beckman, (Palo alto, CA, USA), los termocicladores utilizados fueron PTC 100 de 60 pozos y el Minicycler de 24 pozos JM Research (Watertown, MA, EUA). Para conservar los tejidos se utilizó un congelador vertical (-70°C) So - Low y para conservar las muestras de DNA se utilizó un refrigerador vertical Supermatic (Apodaca, N.L. México)

Para analizar los productos amplificados por la PCR se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal Fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras de electroforesis vertical de 20 x 20 cm y una fuente poder de GIBCO-BRL modelo 250 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA).

Para analizar los geles tanto de agarosa como de poliacrilamida, se utilizó el Sistema fotodocumentador de geles Gel Doc Bio-Rad (Hercules, CA USA) y el programa molecular Analyst de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA), para la determinación de la secuencia nucleotídica se utilizó el DNA sequencer Long Reader 4200 Licor (Lincoln, NE, USA)

3.2 REACTIVOS QUIMICOS

Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCL, trizma base, triton X-100 y fenol, adquiridos de Sigma-Aldrich Química (Toluca, Estado de México) así como los siguientes solventes ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico y etanol de la marca Merck (Monterrey, N. L.)

Para las electroforesis en geles se utilizó agarosa, ácido bórico, acrilamida, EDTA, trizma Base (USB), bromuro de Etidio, azul de bromofenol, xilencyanol, para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base, glicerol, azul de bromofenol, y xilencyanol, todos de la marca Sigma-Aldrich Química (Toluca estado de México). Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizó el DNA del plásmido pUC digerido con la enzima de restricción *Hae III* o *Alu I*. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs (NEB, Beverly MA, EUA) los DNAs plásmidicos se obtuvieron mediante protocolos estándares de extracción de DNA a mediana escala realizadas en la ULIEG descritos por Sambrook y cols, 1989.

Para la purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida obtenidas por SSCP se utilizó el Kit QIAEX II de la compañía Qiagen (Valencia, CA, USA))

Para la determinación de la secuencia nucleotídica se utilizó IRDye 800 terminator mix vivid violet, IR2 solución stop, termo sequenace cycle sequencing y acrilamida 3.7% compañía Licor (Lincoln, NE, USA)

3.3 MATERIALES

Para la obtención de DNA's de las muestras se utilizaron hojas de bisturí, papel aluminio, algodón, gasa, sanitas.

Los tubos eppendorf (0.2, 0.5 y 2.0 ml), tubos cónicos de (15 y 50 ml) las puntillas (de 0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las pipetas de precisión y los guantes látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, Texas, EUA) las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron adquiridas de Rainin Instruments (Woburn MA, EUA).

Para recuperación de las bandas anormales del gel de poliacrilamida del Gel Doc se utilizó pantalla protectora y lentes protectores de luz UV.

3.4 MATERIAL BIOLÓGICO: *PACIENTES Y CONTROLES.*

En pacientes, el material de estudio correspondió a biopsias de tejido (intestino grueso), mientras que en los controles, el material provino de DNA leucocitario aislado a partir de sangre periférica.

3.4.1 Criterios de inclusión: Se estableció que todas las muestras de pacientes a incluirse en el presente estudio debían ser neoplasias epiteliales colorrectales con un diagnóstico anatomopatológico confirmatorio, obtenidas mediante colonoscopia o cirugía abierta. Los controles vienen representados por individuos sanos y sin antecedentes familiares de cáncer.

3.4.2 Muestras de tejido fresco: En nuestro laboratorio existía un banco de DNA y de biopsias de tejido congelado (a -70°C), de pacientes clínica y citológicamente diagnosticados como neoplasias epiteliales colorrectales. Este estudio se inició con dichas muestras de DNA previamente extraídas. De algunas muestras no existía DNA suficiente para el análisis, de manera que se realizó la extracción de DNA a partir de las biopsias de tejido congelado (22, 23). También se continuó con la recolección de nuevas muestras, hasta obtener un total de 72.

3.4.3. Muestras de Sangre Periférica: Se colectó la sangre (anticoagulada con EDTA) de 10 individuos sanos, a partir de la cual se realizó la extracción de DNA mediante la técnica de TSNT (20). Que consiste en la lisis simultánea de las células sanguíneas utilizando los detergentes Tritón X-100 y SDS. El DNA se purificó por extracciones con fenol-cloroformo y finalmente se recuperó por precipitación con etanol.

3.5 ESTRATEGIA GENERAL

El trabajo consistió de dos aspectos: uno de tipo clínico y el otro experimental. En la investigación clínica, se diseñó un cuestionario que incluía datos clínico-patológicos del paciente (ver anexo 1). Los datos clínicos recabados se correlacionaron con los datos moleculares obtenidos. La estrategia metodológica general del trabajo, experimental se describe en (Ver Figura 5).

METODOLOGÍA

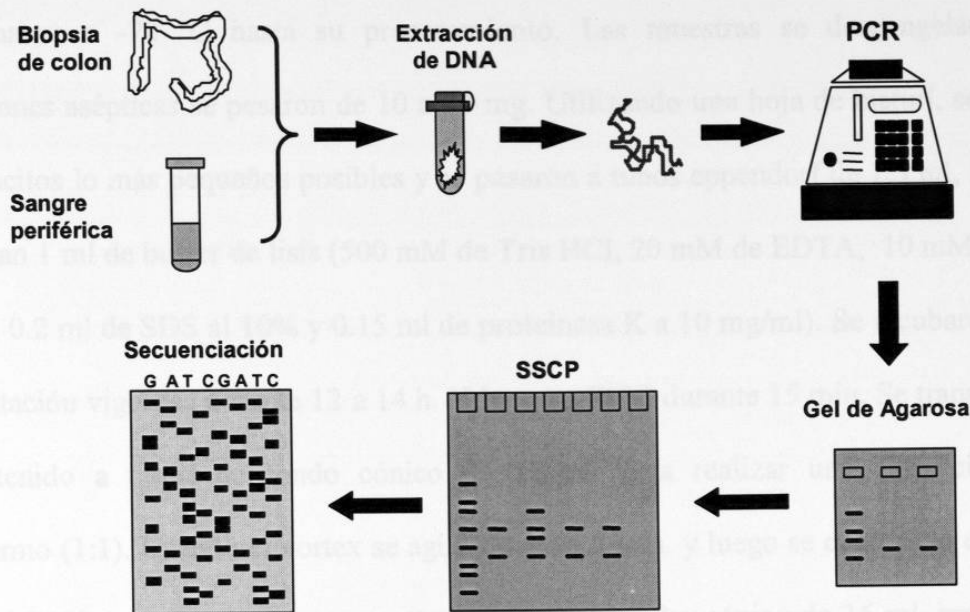


Figura 5. Estrategia General. El DNA obtenido tanto de tejido fresco como de sangre periférica, se sometió a amplificación mediante la PCR de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53, haciendo uso de oligonucleótidos previamente descritos por Chumakov (19). Los productos amplificados se evidenciaron en geles de agarosa y a partir de éstos se realizó la técnica SSCP en geles de poliacrilamida para el rastreo de mutaciones puntuales (25). Las muestras de PCR que presentaron patrón de migración diferente al de las muestras control, se recuperaron, purificaron y secuenciaron por el método de Sanger.

3.6. MÉTODOS.

3.6.1 Extracción de DNA. Para realizar las extracciones, nos basamos en la técnica descrita anteriormente por Vogelstein y cols. (23) con algunas modificaciones (24). Una vez extraído el DNA, tanto su integridad, como su pureza y su concentración se determinaron por electroforesis en gel de agarosa y por espectrometría de luz ultravioleta.

Extracción de DNA de tejido fresco: Todas las muestras de tejido (22,23) se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras se descongelaron 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 de Tris HCl, 20 mM de EDTA, 10 mM de NaCl, a pH 9, 0.2 ml de SDS al 10% y 0.15 ml de proteinasa K a 10 mg/ml). Se incubaron a 48°C con agitación vigorosa durante 12 a 14 h. Y luego a 95°C durante 15 min. Se transfirió todo el contenido a tubos de fondo cónico 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 cónico de 15 ml, repitiendo la extracción una vez más. La fase acuosa final se transfirió a un tubo cónico de 15 ml, se le agregaron 0.33 volúmenes de acetato de amonio a 10 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló suavemente por inversión, se dejó precipitar a -70°C durante 1 h, 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 h en una plataforma agitadora vertical. Finalmente, se procedió a determinar su concentración y calidad.

Extracción de DNA de sangre periférica: Esta se realizó mediante la técnica TSNT (20). En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 2.5 ml de sangre con anticoagulante, se sometió el tubo a centrifugación durante 5 min. a 3,000 rpm en una microcentrífuga; esto con el fin de separar el paquete celular y eliminar el sobrenadante (plasma).

Al paquete celular se le agregó 1 ml de buffer de lisis TSNT (Triton, SDS, NaCl, Tris), y se mezcló el tubo por inversión durante 1 min. Después se le agregó al tubo 0.5 ml de Sevag (cloroformo y alcohol isoamílico, 24:1) y se agitó vigorosamente hasta homogenizar completamente el contenido del tubo durante 5 min, siendo este paso importante para obtener buenos resultados en la extracción. A la mezcla obtenida se le agregó 1 ml de TE 1X, mezcló perfectamente por 1 min, y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min. Se recuperó la fase acuosa que se encuentra en la parte superior utilizando una micropipeta de 1000 μ l para transferirla a otro tubo de 15 ml. El DNA se precipitó agregando muy lentamente y por las paredes 2 volúmenes (aproximadamente 5 ml) de etanol al 100% y se mezcló lentamente por inversión hasta obtener la precipitación del DNA en forma de hebra blanca. Luego se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. y el sobrenadante se descartó, teniendo cuidado que no se desprendiera la pastilla de DNA. Finalmente la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% se mezcló y se centrifugó igual que en el paso anterior. El sobrenadante se descartó con cuidado, la pastilla se secó al aire y enseguida se disolvió en de 100 a 200 μ l de TE, dependiendo de la abundancia de la pastilla. Se procuró despegar la pastilla de la pared del tubo golpeando el fondo del mismo con la mano.

3.6.2 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.

Se utilizó la fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas entre las bases del DNA e inducida por la radiación UV, comparándola con la fluorescencia de una serie de estándares de DNA de concentraciones conocidas. Así mismo, se evaluó la integridad del DNA con 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 1X (0.089 M Tris-Borato y 0.089 M ácido bórico; pH=7.9), disolviendo la agarosa en el amortiguador con calor. Una vez gelificado en el molde, se depositó el gel en una cámara de electroforesis y se cubrió con el mismo. Se preparó una serie de estándares cambiando el DNA a cuantificar por cantidades variables y conocidas de las muestras estándares. La serie de preparaciones se colocó en los carriles del gel, se realizó electroforesis inicialmente a 80 V mientras se internaba el colorante en el, y posteriormente a 110 V por alrededor de 1 h (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 µg/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.

3.6.3. Implementación de la técnica de PCR para los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53.

Gracias a la técnica de la PCR (Ver Fig 6) es posible obtener millones de copias de un gen o segmento de DNA específico, del cual existe una o pocas copias dentro de decenas de miles de genes que constituyen el genoma humano. Es una manera sensible, selectiva y extremadamente rápida de amplificar una secuencia de DNA determinada. La especificidad se basa en el uso de oligonucleótidos primers que se hibridan con secuencias complementarias en tiras opuestas del DNA para *flanquear* la secuencia que se desea amplificar. Para ello, primero la muestra de DNA se calienta para separar las dos hebras que lo constituyen, se permite que los primers se unan al DNA al principio y al final de la región a amplificar, uno en una hebra y el otro en la otra. Cada tira se copia por una DNA polimerasa, que comienza en el primer sitio de cada una de las dos tiras de DNA que sirven como molde para la síntesis del nuevo ácido nucleico a partir de los dos primers. Ciclos repetido de desnaturalización por calor, alineamiento de los primers a sus secuencias complementarias y extensión de los primers con DNA polimerasa conducen a la amplificación exponencial de segmentos de DNA en longitud definida (26).

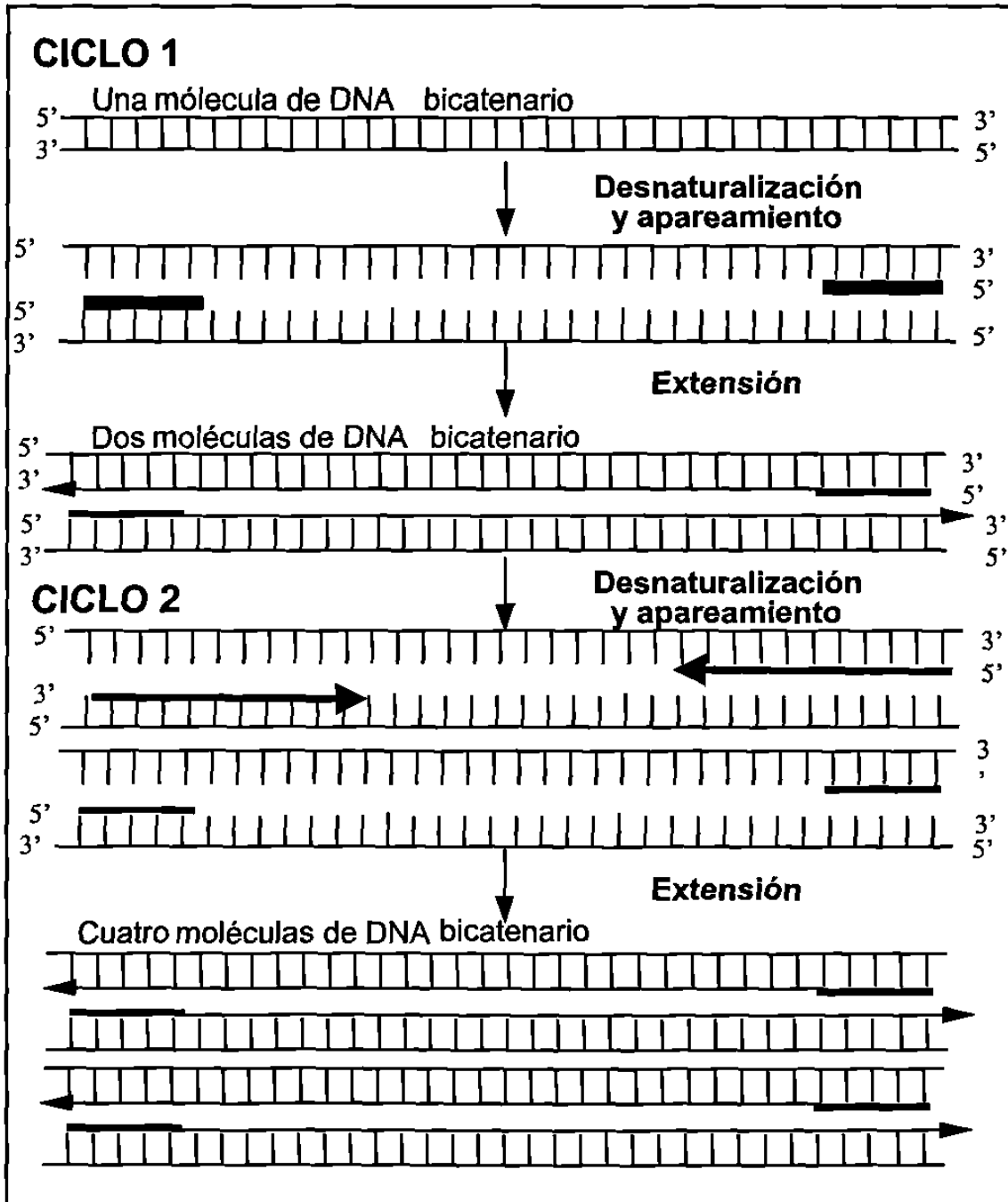


Figura 6. Esquema que representa dos Ciclos de la **Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)**. En cada ciclo se duplican las cadenas de DNA blanco existentes al inicio. Cada ciclo consta de 3 pasos: desnaturalización de las cadenas de DNA, apareamiento a éstas de los iniciadores que permiten a la DNA 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 (27).

Para la amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 se utilizaron los primers ya descritos por Chumakov (19) e indicados en la tabla 2.

Tabla 2 . Características de los primers utilizados en este estudio.

Exón	Secuencia	Amplicón	Temperatura de alineamiento
5	5' TTC-ACT-TGT-GCC-CTG-ACT-TTC. 3' 5' CTC-TCC-AGC-CCC-AGC-TGC-TC. 3'	250 pb	60°C
6	5' ATT-CCT-CAC-TGA-TTG-CTC-TT. 3' 5' CCC-CTC-CTC-CCA-GAG-ACC-CC. 3'	169 pb	55°C
7	5' ACA-GGT-CTC-CCC-AAG-GCG-CG. 3' 5' TGC-AGG-GTG-GCA-AGT-GGC-T. 3'	184 pb	65°C
8	5' GGT-AGG-ACC-TGA-TTT-CCT-TAC-TGC-C.3' 5' CCC-TTG-GTC-TCC-TCC-ACC-GCT-TCT-TG. 3'	227 pb	60°C

La PCR se montó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad, ya que esta reacción es muy sensible a contaminación. Los reactivos necesarios para amplificar incluyen al buffer para la enzima, ésta, los primers, los dNTPs, el MgCl₂, y agua mili Q estéril (25, 28). Las cantidades correspondientes a cada uno de ellos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de reacción para las PCRs.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración Final
Buffer PCR (10X)	2.0	1X
Primer 5' (5µM)	2.0	1µM
Primer 3' (5µM)	2.0	1µM
dNTPs (10 mM)	0.6	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.6	1 mM
Taq polimerasa (5U/µl)	0.2	0.125U/µl
DNA	Variable(100-150ng)	7.5 ng/µl
H ₂ O ultrapura	variable	---
Volumen final	20.0	---

Mientras que las características de los ciclos que integran a las PCRs se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del programa del termociclador para las PCRs

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	95°C	5 min.	Desnat. inicial
2	95°C	30 seg.	Desnaturalización
3	60°C	30 seg.	Apareamiento
4	72°C	40 seg.	Extensión
(2-4) ₃₀			30 ciclos*
5	72°C	5 min.	Extensión final

El resultado de la amplificación se verificó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para corroborar el tamaño del fragmento producido, se utilizó como marcador de peso molecular el plásmido pUC18 digerido con la endonucleasa de restricción *Hae* III.

3.6.4 Estandarización de la técnica SSCP

La técnica más utilizada para el rastreo de mutaciones puntuales es conocida como polimorfismo conformacional de cadena sencilla o SSCP (por sus siglas en inglés de *single-stranded conformation polymorphism*). El análisis por SSCP (29,31) está basado en el principio de que las moléculas de cadena sencilla de DNA asumen, bajo condiciones no desnaturizantes una conformación única que varía dependiendo de su secuencia nucleotídica. El cambio de una sola base puede causar un cambio conformacional en la molécula de DNA y este cambio es suficiente para cambiar la movilidad electroforética.

La SSCP es una técnica simple y rápida que consta de los siguientes cuatro pasos (30) (ver Fig. 7).

Determinación de la frecuencia de mutaciones en el gen supresor de tumores p53 en neoplasias epiteliales colorrectales

- La amplificación por PCR de la región de DNA que se sospecha contiene la mutación de interés, usando primers que flanquean la mutación.
- Desnaturalización del producto de PCR con formamida y calor y su enfriamiento súbito en hielo para mantener las cadenas separadas.
- Resolución de las cadenas de DNA sencillas por electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes.
- La movilidad de las bandas de DNA de referencia, o muestras tipo silvestres se compara con la movilidad de las bandas de muestras conteniendo la mutación.

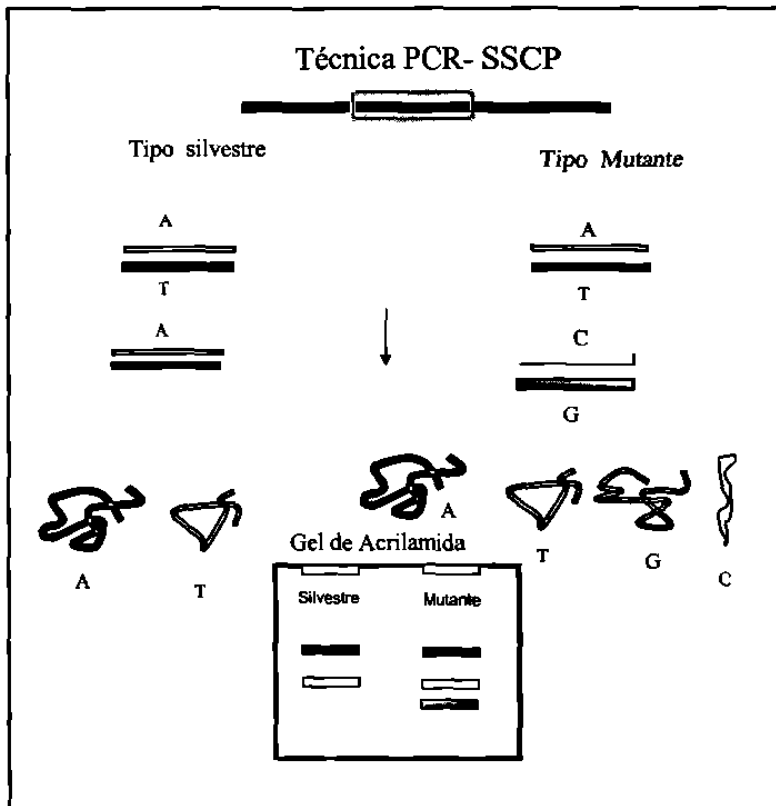


Figura 7. Esquema de la técnica SSCP Una vez obtenida la amplificación del fragmento de interés, éste se desnaturaliza con formamida y calor, manteniéndose así en hielo. Enseguida se corre en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % para observar la migración de las bandas normales y las que se sospechan mutadas (30).

Siguiendo los 4 puntos descritos anteriormente, los productos amplificados a partir del DNA de cada paciente y control, para cada exón, se prepararon de la siguiente manera: En tubos eppendorf de 0.5 ml se agregaron 10 µl de solución stop (Formamida al 95%, xilencianol 0.25%, azul de bromofenol al 0.25%) y 6 µl de producto amplificado, mezclando y se centrifugando por 2 min. Para desnaturalizar los productos amplificados, los tubos se colocaron en el termociclador a 95° C por 5 min. Inmediatamente después, las muestras se colocaron en hielo y enseguida se depositó su contenido en el carril del gel de poliacrilamida, utilizando una jeringa Hamilton de 100 µl. Se llevó a cabo la electroforesis utilizando buffer TBE 0.5% a un voltaje de 185 V durante 7 h, permitiendo que saliera el colorante azul de bromofenol del gel .

Se mezclaron los reactivos siguiendo las proporciones de la tabla 5 para preparar el gel de electroforesis en un vaso de precipitado, inmediatamente la mezcla se vació sobre un juego de vidrios, se colocó el peine, se dejó que polimerice la poliacrilamida, lo que tardó aproximadamente 1 h, se retiró el peine y se enjuagaron los carriles con TBE al 0.5% (preparado con agua mili Q estéril).

Posteriormente, el gel se montó en la cámara de electroforesis y se aplicaron las muestras preparadas como se indicó anteriormente.

3.6.4.1. Preparación del gel de poliacrilamida al 6%:**Tabla 5 . Reactivos utilizados en la preparación de los geles de poliacrilamida al 6 %.**

Reactivo	Volumen (ml)
Agua destilada	19.5
TBE 10X	1.5
Glicerol	3.0
Poliacrilamida al 30%	6.0
*Persulfato de amonio al 10%	0.3
*TEMED	0.03

* Catalizadores (se agregan justo antes de vaciarse el gel en el molde, pues desencadenan la polimerización súbita del gel) (21).

Después de la electroforesis, el gel se recuperó de los vidrios separando éstos haciendo presión con una espátula de aluminio y ayudándose si fuere necesario con un poco de agua destilada. Se procedió a teñirlo el gel con una solución de bromuro de etidio recién preparada, sumergiéndolo en ésta por 5 min, para luego observarlo en el transiluminador Gel Doc 1000. Algunos geles se tiñeron con plata pero se encontró que tenía la misma sensibilidad que la tinción con bromuro de etidio.

3.6.4.2. Obtención de las bandas anormales del gel de poliacrilamida: Una vez que se observó la presencia de bandas anormales, éstas se recuperaron con una hoja de bisturí estéril, cortando el gel en varios pedacitos, que se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 50 µl de agua mili Q estéril, se agitó a una temperatura de 85° C por 5 min. y 65° C por 30 min. en el thermomixer. Una vez que el DNA se eluyó, la solución conteniendo el DNA se diluyó con agua (1:5) y ésta se utilizó para realizar nuevamente una reacción de PCR, empleando los mismos primers y condiciones que se usaron para amplificar el producto original de donde se tomó la banda.

Se verificó la amplificación en un gel de agarosa al 2%, y la banda se recuperó y purificó utilizando un estuche comercial de la marca Qiagen (Valencia, CA, USA).

3.6.4.3. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa: La porción del gel de agarosa que contiene la banda del producto amplificado se cortó en pedacitos sobre papel aluminio con una hoja de bisturí, se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó por 2 min. a 14,000 rpm para estimar el volumen de agarosa, enseguida se añadieron 3 volúmenes de QX I y se mezcló el contenido del tubo suavemente, se resuspendió el QIAEX II (silica) por vortex durante 30 seg. Se agregaron 10 µl de ésta al contenido del tubo, se mezcló y se selló la parte superior del tubo eppendorf con parafilm, para incubar a 55° C con agitación en el thermomixer durante 15 min. Después se centrifugó por 30 seg. a 14,000 rpm para remover el sobrenadante y se volvió a repetir el paso anterior con la finalidad de eliminar todos los restos de agarosa. La pastilla se lavó 2 veces con 500 µl del buffer PE y se dejó secar al aire por 10-15min.

Para extraer el DNA de la pastilla se utilizaron 20µl de TE IX, se mezcló muy bien, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. se transfirió cuidadosamente el sobrenadante (el cual contiene ahora el DNA puro) a un tubo nuevo de 0.5 ml, quedó listo para ser utilizado en la secuenciación.

3.6.5 Secuenciación (determinación de la secuencia nucleotídica) de los productos purificados.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron utilizando los iniciadores 5'y 3' para cada exón. Utilizando el método enzimático de secuenciación ideado por Sanger, el cual se basa en la síntesis de la cadena complementaria a la cadena secuenciar (DNA molde, se inicia a partir de un oligonucleótido que se aparea específicamente y se termina con la incorporación aleatoria de un análogo dideoxi de los nucleótidos (didesoxiribonucleósido trifosfato o ddNTP), lo que impide la elongación ulterior del DNA (32). Se comienza realizando una PCR utilizando una DNA polimerasa termoestable, este método es cíclico y consta de 4 pasos:

- 1) Desnaturalización de la molécula DNA molde para separar sus dos cadenas.
- 2) Apareamiento de un solo primers a la cadena blanco que va a ser secuenciada.
- 3) Síntesis de la cadena DNA al incorporar nucleótidos. Utilizando la enzima Thermosequenace Cycle Sequencing kit.
- 4) Durante el transcurso de la síntesis, la elongación de la nueva cadena se inhibe de manera aleatoria al incorporar un análogo de los dNTPs (ddNTP) los cuales están marcados con cromógeno IRDye 800.
- 5) estos pasos se repiten de 30 a 35 veces permitiendo así obtener la secuenciación del fragmento molde a partir de una cantidad mínima de DNA.

Después de concluir la PCR, el siguiente paso es de purificación y concentración de la muestra, dicho procedimiento se llevó a cabo agregando a la muestra 1 μ l de una solución Coprecipitante (vivid violet) más 1 μ l de acetato de sodio 3M con un pH de 5.4 más 2.5 volúmenes de etanol al 100%, seguido de un periodo de incubación de 30 min, a temperatura ambiente. El siguiente paso, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min, observándose una pastilla de color rosado en el fondo del tubo la cual nos indica que se llevó a cabo la precipitación, posteriormente se lavó la pastilla con etanol al 70% aproximadamente 100 μ l y se centrifugó nuevamente por 30 min a 14,000 rpm con el fin de retirar los ddNTP's no incorporados junto con los primers, restos de sales y proteínas provenientes de la reacción de PCR.

Se retiró el etanol con una pipeta se secaron los tubos en el savant durante 10 min, después agregamos 3 μ l de solución stop homogenizamos (se almacenan a -20°C) o bien se mezclan en un vortex, dando un spin, desnaturalizamos a 95°C por 5 min, quedando las muestra listas para ser depositadas en el gel de poliacrilamida kb plus 3.7% se colocaron 1.5 μ l por pozo de cada muestra (fragmentos marcados) se corrió la electroforesis a 3,000 V por 4 h durante la corrida de las muestras se hacen pasar a través del secuenciador DNA secuencier Long Arder marca Li-Cor el cual contiene un rayo láser infrarrojo en donde al pasar las muestras emiten una señal a una longitud de onda determinada. Esta señal es registrada en una computadora la cual contiene el programa específico (e-Seq) permitiéndonos así hacer el análisis de las muestra.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

Se recolectaron 72 biopsias de tejido fresco y 10 muestras de sangre periférica que se analizaron por igual. De los 72 pacientes, 28 fueron mujeres (39%) y 44 hombres (61%). El rango de edad fue de 18 a 92 años. De los 10 controles 6 fueron mujeres (60%) y 4 hombres (40%) y el rango de edad fue de 26 a 40 años. Los datos de distribución de los pacientes por edad se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Distribución por edades de los pacientes.

EDAD	MUJERES	%	HOMBRES	%
11 – 20	1	1.25	2	2.5
21 – 30	2	2.5	2	2.5
31 – 40	2	2.5	3	3.75
41 – 50	7	8.75	9	11.25
51 – 60	4	5.0	9	11.25
61 – 70	8	10.0	6	7.5
71 – 80	2	2.5	10	12.5
81- 90	2	2.5	2	2.55
>90	0	0.00	1	1.25
Total	28	35	44	55.0

De acuerdo a la histología de las neoplasias, 8 (11.10%) fueron pólipos benignos, 16 (22.20%) se clasificaron como adenomas y 48 (66.6%) como adenocarcinomas. En la tabla 7 se especifica la sub-clasificación.

Tabla 7 Sub-clasificación de los adenomas y adenocarcinomas.

Adenomas	16
adenoma tubular	8
adenoma vellosa	3
adenoma mixto	5
Adenocarcinoma	48
Adenocarcinoma bien diferenciado	8
Adenocarcinoma mod diferenciado	15
Adenocarcinomas poco diferenciados	25
Polipos no neoplásicos	8

4.2 DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR.

4.2.1 Construcción del banco de DNA genómico

Se extrajo DNA genómico de biopsias de tejido fresco de pacientes de los cuales teníamos muestras insuficientes (19 muestras). Las muestras de DNA tienen una concentración que osciló entre 25 y 750 ng/ μ l, en volúmenes entre 20 y 150 μ l, para dar un rango de cantidades de DNAs recuperados de las muestras de entre 500 ng y 112.5 μ g. La integridad del DNA en las muestras fue aceptable, ya que sólo en algunas cuantas se observó una ligera degradación del mismo (Ver Fig. 8).

Para la cuantificación de DNA se utilizó un estándar de DNA de concentración conocida, y geles de agarosa al 1% disuelta en buffer TBE 1X.

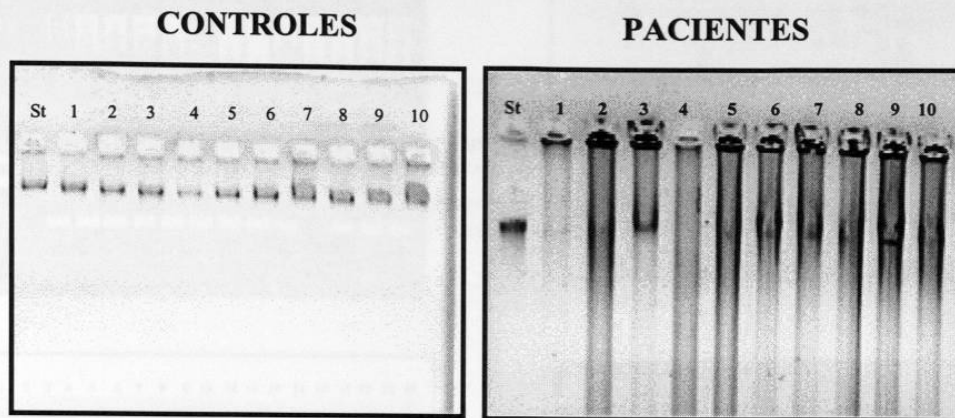


Figura 8. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 1%. En el gel de la izquierda se resolvieron DNAs extraídos a partir de muestras de individuos sanos (1-10) de sangre periférica, mientras que en el gel de la derecha se resolvieron DNAs correspondientes a las muestras (1-10) de tejido fresco de los pacientes St=Estándar de concentración conocida.

4.2.2 Amplificación de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53

Una vez cuantificado el DNA, se realizó la estandarización de la técnica de PCR para amplificar los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53, para todos los DNA's (72 pacientes y 10 controles), se obtuvieron los productos amplificados correspondientes a los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53. En la figura 9 se pueden observar las bandas correspondientes.

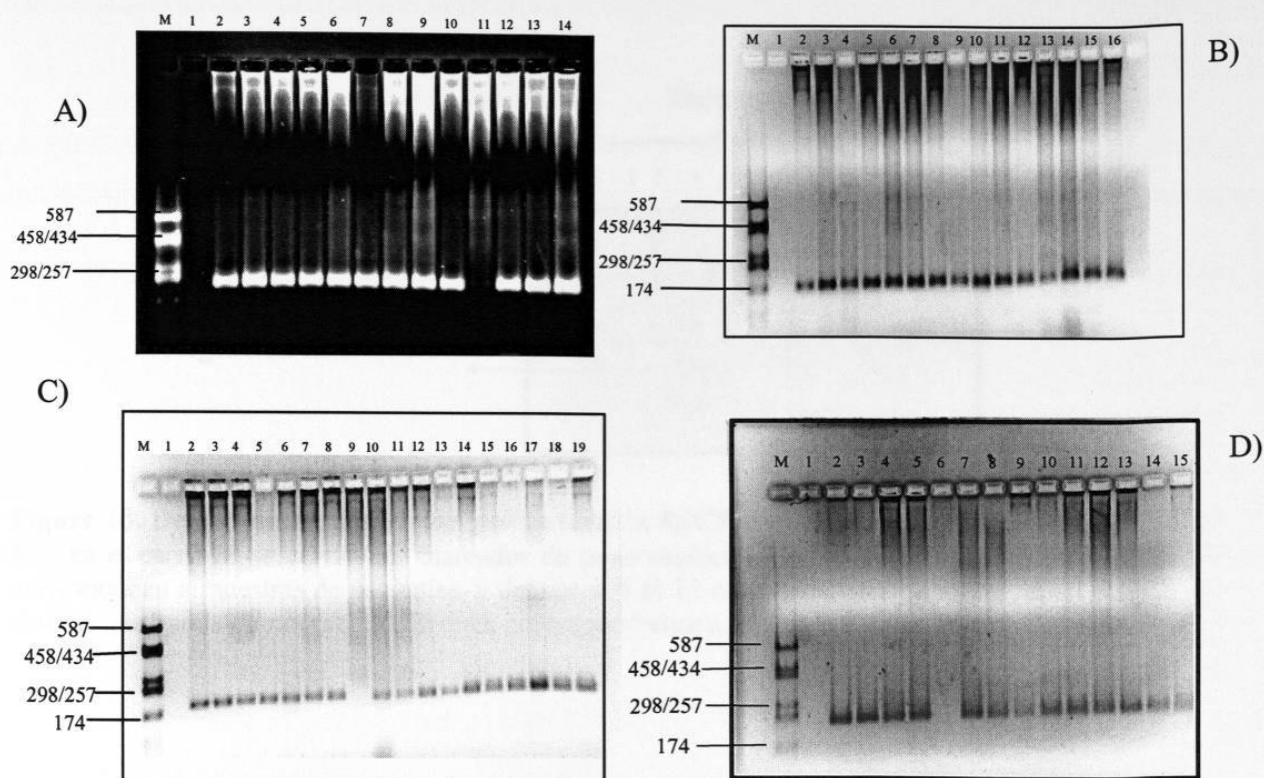


Figura 9. Análisis electroforético de los productos generados por la PCR. Para corroborar el tamaño del fragmento producido en la PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se corrió en el carril M el marcador de peso molecular, en el carril 1 el testigo negativo de la (PCR), del carril 2 al 7 corresponden a los productos amplificados de individuos sanos (controles), marcando las siguientes diferencias: Gel **A)** los carriles 8 en adelante corresponden a productos amplificados (250pb) del exón 5 en muestras de pacientes. Gel **B)** Se corrieron productos amplificados (169) para el exón 6. Gel **C)** Se corrieron productos amplificados (184 pb) para exón 7. Gel **D)** Se corrieron productos amplificados para el exón 8 (227pb) a partir de DNA genómico (28).

4.2.3. Análisis de los productos amplificados por SSCP

A los productos amplificados se les realizó el análisis de mutaciones por la técnica SSCP. A continuación se muestran unos geles (Ver Fig. 10 y 11) donde se puede observar la presencia de bandas que tienen un patrón de migración diferente a las muestras controles, estas bandas fueron recuperadas del gel de poliacrilamida para posteriormente realizar su reamplificación, purificación y secuenciación.

Tabla 8. Recapitulación de los resultados de la técnica SSCP en el exón 6.

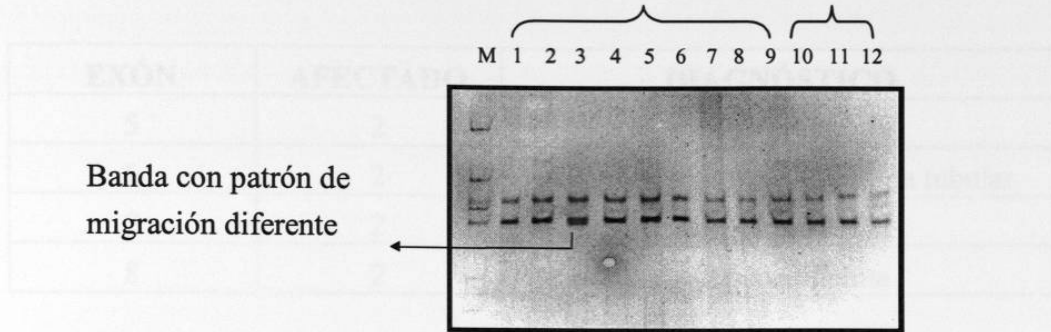


Figura 10. Detección de mutaciones por la técnica SSCP. Se muestra un gel de poliacrilamida al 6%, en el carril M se corrió un marcador de peso molecular (M) pUC 18. En los carriles 1 al 8 corresponden a muestras de pacientes, y del carril 9 al 12 corresponden a controles, en el carril 3 se detectó una banda de migración diferente correspondiente a un producto amplificado del exón 6.

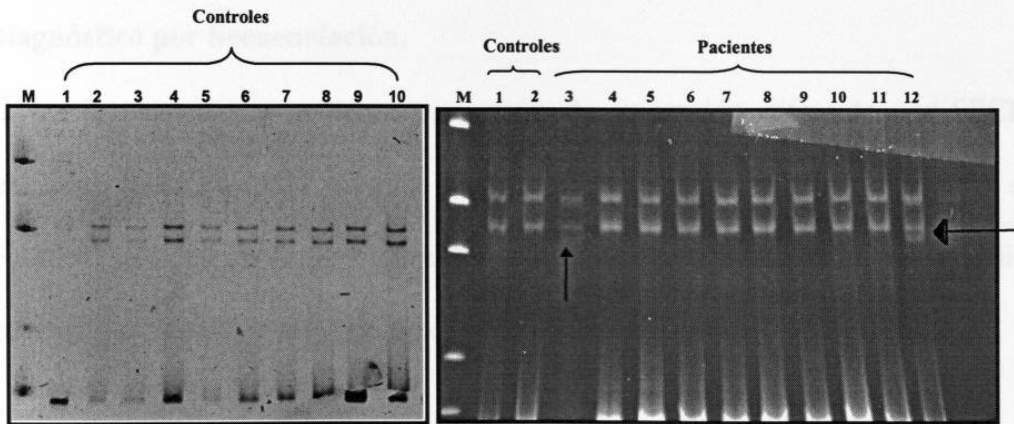


Figura 11. Detección de mutaciones por la técnica SSCP. En ambos gels se usó un marcador de peso molecular (M) pUC 18. En el gel de la izquierda se muestra el patrón de migración de las bandas de los controles negativos, mientras que en el gel de la derecha se detectó una banda de migración diferente en dos muestras de pacientes, señalados con (→) en el exón 8, en los carriles 3 y 12 las cuales se recuperaron, volvieron a amplificar, purificar y se sometieron a secuenciación (29).

En la tabla 8 se muestran el total de bandas anómalas encontradas, así como el exón en el cuál se localizaron y el diagnóstico del paciente.

Tabla 8. Recapitulación de los resultados de los SSCP con corrimiento alterado:

EXÓN	AFECTADO	DIAGNÓSTICO
5	2	Adenocarcinoma
6	2	Adenocarcinoma / Adenoma tubular
7	2	Adenocarcinoma
8	2	Adenocarcinoma

En los controles no se observó alguna banda con corrimiento anormal.

Las bandas seleccionadas fueron purificadas y reamplificadas para después de una nueva purificación, determinar su secuencia nucleotídica

4.3 Diagnóstico por Secuenciación.

Todas las bandas que presentaron un patrón de migración diferente por SSCP, fueron secuenciadas junto con una muestra control. En la figura 12 se muestra la secuencia nucleotídica leída en un control normal y comparada con la secuencia nucleotídica de un paciente para el exon 5, mostrando un cambio en la secuencia.

Los resultados de la secuenciación obtenidas se alinearon mediante el programa CLUSTAL con la secuencia reportada para el exón correspondiente de p53, para identificar los cambios nucleotídicos y deducir los cambios aminoácidos. En la figura 13 se muestra el resultado del alineamiento de la secuencia del exón 8.

CLUSTAL W(1.5) multiple sequence alignment

```

exon8n      TCCTGAGTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTG
mut5y59a    TCCTGAGTAGTGGTAATCTACTGGGATGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTG
*****

exon8n      TCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCAC
mut5y59a    TCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCAC
*****

exon8n      CACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGC
mut5y59a    CACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGC
*****

```

Figura 13. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas. Se esquematiza el alineamiento de la secuencia de DNA (del exón 8) del gen p53 silvestre reportada en la literatura y la obtenida al secuenciar dos de las muestras de los pacientes (5, 59). Los (*) señalan los nucleótidos similares y los espacios en blanco son los nucleótidos disímiles entre ambas secuencias.

4.3.1. Mutaciones encontradas.

En la Tabla 9 que se muestra a continuación se recapitulan los cambios aminoácidos ocasionados por las mutaciones encontradas, todas las mutaciones observadas habían sido previamente descritas por diferentes autores. En el caso de los exones 5 y 7 se encontraron mutaciones diferentes mientras que en los exones 6 y 8 el cambio fue idéntico para las dos muestras afectadas, así como la referencia donde la mutación en particular había sido descrita previamente.

De las 9 bandas anormales analizadas por secuenciación, solo en 8 se encontraron mutaciones: 2 en pacientes del sexo femenino y 6 del sexo masculino. La edad de los pacientes que presentaron mutaciones osciló entre 20-28 años y 40-85 años, respectivamente.

Tabla 9 Resultados obtenidos en la secuenciación.

Exón	n	Codón	Nucleótido	Cambio de aa	Referencias
5	1	175	CGC-CAC	Arginina / Histidina	Goh (1995)
	1	157	Inserción G	Valina / Glicina Stop 180	Nagai MA (1998)
6	2	213	CGA - CGG	Arginina / Arginina	Kucera E,(1999)
7	1	237	Inserción T	Glutamato / Aspartato	Bertorelle (1995)
	1	248	Inserción T	Arginina / Leucina	Hernández y Hainaut (1998)
8	2	267	CGG - TGG	Arginina / Triptófano	Ishii N. (1999)

Relación entre características de los tumores y la presencia de mutaciones

Siete de las mutaciones detectadas se encontraron en adenocarcinomas, siendo solo una la que se encontró en un adenoma.

Tabla 10 Frecuencia de mutaciones en p53 por estadio histopatológico

Histopatología	n	mutaciones	%
Pólipos no neoplásicos	8	0	0
Adenomas	16	1	6.25
Adeno Carcinomas	48	7	14.58
total	72	8	11.11

Las mutaciones encontradas son 3 cambios puntuales del tipo transición (purina - purina, o pirimidina - pirimidina), 3 inserciones y 2 mutaciones silenciosas, solo en un caso de las bandas anormales secuenciadas la lectura no reveló mutación alguna.

De las 8 mutaciones encontradas, 7 correspondieron a Adenocarcinomas y en 5 de éstos el tumor se localizó en el colon izquierdo mientras que 2 fueron en el colon derecho. Solo una mutación se encontró en un paciente con diagnóstico de adenoma

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

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

Debido a que las muestras se recolectaron en dos hospitales regionales, podemos decir que las muestras son representativas de la región. Del total de muestras recolectadas (72). Encontramos una predominancia por del sexo masculino (75%).

La edad en que oscila la presencia de esta neoplasia de acuerdo al sexo va desde los 17 hasta los 92 años. El diagnóstico histopatológico más frecuente fue el de adenocarcinoma, el cual correspondió al 66.7% del total. Los adenomas contribuyeron el 22.2% y los pólipos no neoplásicos al 11.2 % .

La frecuencia de mutaciones para adenocarcinomas fue de 11.11%, la cual es más baja que la reportada por Leung el analizó mutaciones en el gen p53 por PCR - SSCP y secuenciación directa a 99 carcinomas colorrectales de pacientes en Hong Kong reportando un 35.4%. Hamelin y Van Den Broek, 41.7% y Goh 57%. La frecuencia reportada por Yamaguchi para adenomas es del 25%, la cual es más alta que lo encontrado en nuestro estudio 22.2%.

No se encontraron mutaciones ni en los controles ni en los pólipos no neoplásicos como era de esperarse.

La frecuencia de mutaciones para cada exón fue la misma en nuestro estudio. La frecuencia de mutaciones en el gen p53 en nuestra población, resulto diferente a la del resto de las poblaciones estudiadas. Sin embargo, nuestro estudio coincide con otros previos en cuanto a que las mutaciones son más frecuentes en adenocarcino más que en adenomas, corroborando que p53 es un gen que se altera en etapas finales de la evolución de dicho cáncer.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

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

1. De los 72 pacientes analizados por SSCP, se encontraron 9 variantes.
2. De las 9 variantes analizadas por secuenciación, se caracterizaron 8 mutaciones reportadas con anterioridad.
3. No hubo diferencia significativa en cuanto a la edad.
4. El porcentaje de variantes (mutantes) encontradas en pacientes con cáncer CCR es menor que los reportados para otras poblaciones.
- 5.- Las variantes encontradas provienen de 7 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma y un paciente con diagnóstico de adenoma.
- 6.- Ninguna variante fue encontrada en pacientes con pólipos no neoplásicos, indicando que p53 es un gen que se altera en etapas finales de la evolución de dicho cáncer.

CAPITULO 7

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. Aumentar el número de muestras de estudio para validar nuestros resultados con las de otros grupos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Shike M, Beart R. (1990) in textbook of Clinical Oncology, Murphy Eds. (American Cancer Society), Atlanta 1991, 213-218.
- 2.- Twelve Mayor Cancers.(1996) Scientific American September. 92-98
- 3.- Harrison T.R, (1998) Principios de Medicina Interna Biología Celular del Cáncer. Cáncer del Intestino Grueso 14 edición Vol 1, 575-584.
- 4.- Dirección General de Estadísticas e Informática SSA (1987-1997) Registro Histopatológico de Neoplasias en México.
- 5.- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA, (1998) Cancer statistics, CA Cáncer J Clin 48: 6-2
- 6.- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y White R, Smits AMM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. New Eng. J. Med 319:525
- 7.-Kenneth W. K, Vogelstein B, (1999) Colorrectal Tumors The Genetic Basis of Human Cancer Ed Mc Graw Hill 565-581.
- 8.- Hernández T and Hainaut P (1998) Tumor-Specific mutation Spectra in the Human p53 Gene: From Carcinogen "Fingerprints" to functional consequences. Environ Carcino. & Ecotox. Revs C 16 (1), 31-45

- 9.- Murray R.K., (1987) *Cáncer, Oncogenes y Factores de Crecimiento*
Bioquímica Ed. Manual Moderno 14ª Edición 887-911
- 10.- Roskoski R Jr. (1997) *Cáncer, Oncogenes y Genes Supresores de tumores*
Bioquímica Ed. McGraw-Hill Interamericana editores S.A. de C.V. México :463-483
- 11.- Watson J, Gilman M (1992) *The several steps to Colorectal Cancer Recombinant DNA* 361-364 2 Edición 361-364
12. - Fearon E R. And Vogelstein B (1990) *A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis Cell June Vol. 61 759-767.*
- 13.- Hollstein M, Sidransky D (1991) *P53 Mutations in Human Cancers. Science July Vol 253 49-53*
- 14.-Levine A.J., M.E. Perry, A. Chang (1993) *The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. 41-416.*
- 15.- Lewin B. (2000) *Tumor suppressor p53 suppresses growth or triggers apoptosis. Oncogenes y Cancer Genes VII C28 Ed Oxford 1161-1171.*
- 16.-Baker SJ, Reisinger AC, Jessup JM, Markowitz S, Wilson J.K. (1990). *p53 Mutation occur in combination with 17p allelic deletion as late events in colorectal tumorigenesis Canc. Research 50 7717-7722*

- 17.- Leing CS, Cheung MH, Wong CM, Lau KW, Tang CM, Lung ML, (1997) p53 mutations detected in colorectal carcinoma patients in Hong Kong . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Nov 6 (11) 925-930
- 18.- Goh HS, Yao J, and Smith DR (1995) p 53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Research* 50 (23) 7717-7722
- 19.- Buchman L, Chumakov PM, Ninkina NN; Samarino OP, Gerogiev GP (1998) A variation in the structure of the protein coding region of the human p53 gene. *Gene*, 70, 245-252
- 20.- Martínez Soriano JP, Cab Barrera EL, Tamez González R, Leal Klevezas DS, (1993) Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa *Bioquímica* 18 10-16
- 21.- Faille A, P De Cremoux, J M Extra, .M. Linares G,. (1994) p53 Mutations and Over expression in locally advanced breast cancers. *Br. J. Cancer* 69, 1145-1150.
- 22.- Strauss, M.W. Ausubel, F.M. Brent, R. Kingston, R.E. Smith, J.A. (1989) Preparation of genomic DNA from mammalian tissue *Current protocols in Molecular Biology* Vol 1, pp 2.2.1.-2.2.3. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 23.- Goelz SE, Stanley R. Vogelstein, B (1995) Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol 130 118-126

24.- Martínez Garza, S.G. (1998) Detección de mutaciones en el oncogen K-ras en neoplasias epiteliales colorrectales

25.- Orita, M. Suzaki, T. Sekiya, Y. and Hayashi K 1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase Chain reactions Genomics, 5: 874-879.

26.- Barrera Saldaña H.A., Ortiz López R., Rojas Martínez A., Reséndez Pérez D. (1993) Reacción en cadena de la polimerasa; una nueva época dorada en Biología Molecular. Ciencia y Desarrollo: 50-60.

27.- Barrera Saldaña H.A. (1992) Introducción Genética Su estructura y Función y Manipulación 58-60

28.- Yamaguchi Kensei, Sugano Kokichi (1997) Polymerase Chain Reaction-Based Approaches for Detection of Allelic Loss in the p 53 Tumor Suppressor Gene in Colon Neoplasms Journal Gastroenterology Vol 92 N° 2 307-312.

29.- Kurvinen Kaisa Hietanen (1995) rapid and effective detection of mutations the p53 gene using nonradiative single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on Phast System Elsevier Science B.V. 43-52

- 30.- Bailey A, L. Michael A I, Gelfand D H (1995) Single-Stranded Conformational Polymorphisms PCR Strategies Academic Press Inc 121-128.
- 31- Kogan,S.C.(1987) Protocol: Analysis of p53 Point Mutations Using PCR.N.Engl.J.Med 317 985-990
- 32.- DNA sequencing Manual (1999) Section 4 LI_COR INC pag 4-5 a 4-8
- 33.- Ruley H. Earl (1996) p 53 and Response to Chemotherapy and Radiotherapy 3 Important Advances in Oncology 3751.
- 34.-Sugai T, Habano W, Nakamura Si, Vesugi N, Sasou S, Itoh C (2000) A unique method for mutations análisis of tumor suppressor genes in colorectal carcinoma a crypt isolation technique Arch Pathol Lab Med Mar 124 (3) 382-6
- 35.-Van Den Brek MH, Renault B, Fodde R, Verspaget H, Griffioen G, Khan PM, (1993) Sites and types of p53 mutations in an unselected series of colorectal cancers in the Nertheland Anticancer Res.13: 587-592
- 36.- Hamelin R, Jego N, Laurent-Puig, Vidaud M Thomas G (1993) Efficient screening of p53 mutations by denaturig gradient gel electrophoresis in colorectal tumors Oncogene 8 2213-2220

37.- Lynch J (1997) The Genetics and Natural History of Hereditary Colon Cancer
Seminars in Oncology Nursing Vol 13 N° 2 May 91-98

38.- Carethers J M, (1996) The Cellular and Molecular Pathogenesis of Colorectal
Cancer gastroenterology Clinics of North America 737-753

39- Van den Briek MH, J Hanwar SC (1994), p53 mutations in colorectal cancers in the
patients of Metropolitan New York Ann Acad Med Signapore Nov 23 (6) 803-9

40.-Hainaut, P. Hernandez T, Robinson, A (1998). IARC Database of p53 gene
mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new
visualisation tools Nucleic acids Research Vol 26 N° 1 205-213.

APÉNDICE 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Ácido etiléndiaminotetracético (EDTA) 0.5 M pH = 8.0.

Disolver 186.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml de H_2O destilada. Ajustar el pH a 8.0 con Na OH y aforar a 1 L.

Acrilamida /bisacrilamida (29:1).

Disolver 29 g de acrilamida y 1 g de N' N' metilenbisacrilamida en 60 ml de agua destilada. Calentar la solución a 37°C para disolver los reactivos. Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Checar que el pH de la solución sea de 7 o menor, almacenar en frasco obscuro a temperatura ambiente, guardar en frasco cubierto con papel aluminio y almacenar a 4°C.

Bromuro de etidio 2 mg/ml.

Disolver 200 mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua ultrapura aforar a 100 ml y almacenar a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar. De esta solución se hará una dilución 1:1000 para teñir los geles. No autoclavar.

Buffer de lisis TSNT.

Disolver 1 ml de trítón y 5 ml de SDS 10% en agua miliQ estéril (aforar a 20 ml y mezclar) hasta que la solución quede incolora. Por separado disolver 0.2922 g de NaCl 0.01861 g de EDTA y 250 µl de Tris - HCl pH de 8 2M en 20ml de agua Mili Q estéril y aforar a 30 ml. Mezclar la solución de detergentes con la solución de sales. No autoclavar.

Fenol saturado.

El fenol debe ser redistilado para remover los productos de oxidación, como quinonas que pueden causar el rompimiento de los enlaces fosfodiéster o entrecruzamientos de RNA y DNA.

A) Destilación del fenol

- Fundir el fenol a 68°C.
- Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino El fenol destila a una temperatura de 180°C. Es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante.
- El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-HCl 0.5M para evitar su cristalización.

B) Saturación.

Antes de usar el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

1. Agregar 8-hidroquinoleina a una concentración final de 0.1%.
2. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris - HCl 0.5 M pH 8 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 agitar durante 24 horas en el cuarto frío.
3. Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta concentrada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.
4. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH 8.
5. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8 conteniendo B-mercaptoetanol a una concentración final 0.2%.
6. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C.

Gel de agarosa al 1%.

Pesar 1 g de agarosa y agregar 100 ml de TBE 1X, fundir.

Gel de agarosa al 2%.

Pesar 2 gr de agarosa y agregar 100 ml de TBE 1X, fundir.

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% glicerol 30%).

Mezclar 25 mg de xilencianol 25 mg de azul de bromofenol y 3.0 ml de glicerol aforar a 10 ml. No autoclavar.

SDS 10% (Dodecil sulfato de sodio).

Disolver 10 gr de SDS en 60 ml de H₂O y aforar a 100 ml

TBE 10X (tris- borato 0.89 M ácido bórico 0.89 M, EDTA)

Mezclar 108 g de trizma base y 55.0 gr de ácido bórico y disolver en 800 ml de H₂O, agregar 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y aforar a 1 L

Persulfato de amonio al 10%.

Disolver 10 gr de persulfato de amonio en 100 ml de agua destilada conservar a 4°C en recipiente cubierto con papel aluminio.

Proteinasa K 10 mg/ ml.

Disolver 100 mgs de proteinasa k en 10 ml de agua ultrapura. Dividir en alícuotas de 500 µl y almacenar a -20°C.

SEVAG.

Mezclar 40 ml de alcohol isoamílico y 960 ml de cloroformo.

Solución Stop.

Mezclar formamida al 95 % 9.5 ml, hidróxido de sodio a 10 mM, azul de bromofenol 0.25 %, xilencyanol al 0.25 % y aforar a 10 ml con agua destilada.

APÉNDICE 2

INFORMACIÓN BÁSICA

Datos Generales

Hospital _____ 1 H.U. 2.Metro. 3 Mugerza. 4. Sn José 5. Otros (especificar)
 Servicio _____ 1 Gastroenterología 2.Cirugía. 3. Patología 4. Otros (especificar)
 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	

Cirugías no colonicas (tipo, fecha, Dx) _____

Patología previa neoplásica, benigna y maligna

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

Patología previa intestinal _____ duración (años) _____

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

Sintomatología asociada a padecimiento actual _____ duración _____

1.-Estreñimiento crónico	6.-Tenesmo
2.-Diarrea	7.-Pujo
3.-Diarrea / estreñimiento	8.-Dolor Abdominal
4.-Sangre en heces	9.-Otro (especificar)
5.-Sangrado transrectal	

Datos del tumor.

Dx histológico _____

Tipo macroscópico _____

Diámetro máximo _____

Localización _____

Grado de invasión _____

Tratamiento Quirúrgico.

Tipo	Fecha	Diagnóstico
1.- _____	_____	_____
2.- _____	_____	_____
3.- _____	_____	_____

Tratamiento Postoperatorio _____

Tratamiento quirúrgico			
	Tipo	Fecha	Diagnóstico
1.-	_____	_____	_____
2.-	_____	_____	_____
3.-	_____	_____	_____
4.-	_____	_____	_____
Tratamiento postoperatorio			_____



