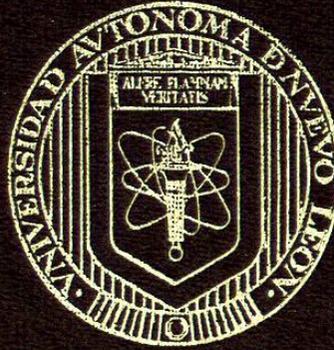


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS FARMACOGENETICO Y FUNCIONAL
DEL GEN *Timidilato Sintasa* EN CANCER
GASTROINTESTINAL

Por

Q.F.B. CLARA PATRICIA RIOS IBARRA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con orientación terminal en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Enero 2007.

TM

QH450

.R5

2007

c.1

C.F.B. CLARSA PATRICIA FRIOS IBARRA



1080158443

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO Y FUNCIONAL
DEL GEN *Timidilato Sintasa* EN CÁNCER
GASTROINTESTINAL

Por

Q.F.B. CLARA PATRICIA RIOS IBARRA

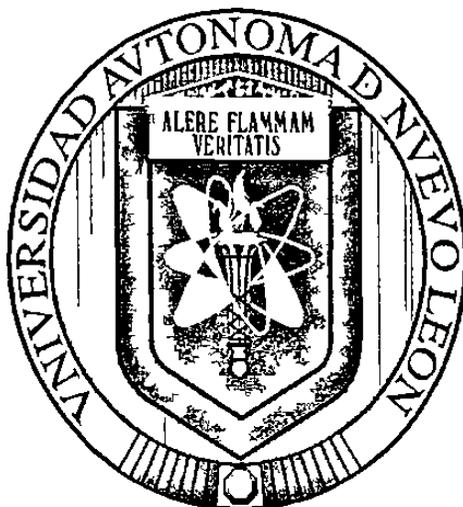
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con orientación terminal en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Enero 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO Y FUNCIONAL DEL
GEN *Timidilato Sintasa* EN CÁNCER
GASTROINTESTINAL**

Por

QFB CLARA PATRICIA RÍOS IBARRA

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA
EN CIENCIAS con orientación terminal en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

Enero 2007

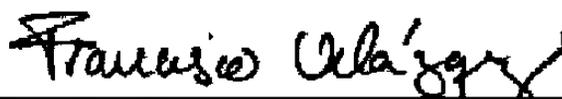
**ANALISIS FARMACOGENETICO Y FUNCIONAL DEL
GEN TS EN CANCER GASTROINTESTINAL**

Aprobacion de la Tesis



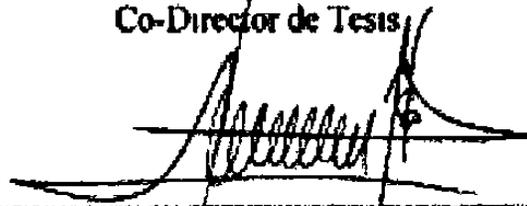
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Director de Tesis



DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO

Co-Director de Tesis



DR. JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ GUERRERO

Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la Co-Dirección del Dr. Francisco Velázquez Vadillo y el Dr. Juan Francisco González Guerrero.

AGRADECIMIENTOS

Con respeto y cariño a mi Directora de Tesis la **Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.**

A todos mis **Maestros.**

A mis **amigos**, en especial: Daniel, Miguel, Katy, Lily, Kary y Angel.

Al **Departamento de Bioquímica.**

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León.**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para mi formación académica durante la Maestría.

Al **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT)**, por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Velázquez Vadillo, Dr. Francisco González Guerrero, Dr. Francisco Bosques Padilla, Dra. Elvira Garza Garza y Dr. Juan Pablo Flores.

DEDICATORIAS

Para Dios, *Pater Noster*.

Para mi **mami**, **Sra. Laura Ibarra González**; mi angelito de
la guarda en la tierra.

Para mi **papi**, **Sr. Héctor Manuel Ríos Valdés**; mi angelito de
la guarda en el cielo.

Para mis **hermanitos** **Eugenia, Brenda y
Abraham**.

E Scientia Hominis Salus

TABLA DE CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	vi
INDICE	
CAPÍTULO I	
1.1 RESUMEN	1
1.2 INTRODUCCIÓN	2
1.2.1 CÁNCER GASTROINTESTINAL	2
1.2.2 FARMACOGENÉTICA	3
1.2.3 5-FLUOROURACILO	4
1.2.4 TIMIDILATO SINTASA	6
1.2.5 DIHIDROPIRIMIDINA DESHIDROGENASA	8
1.2.6 METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA	8
1.2.7 TIMIDINA FOSFORILASA	9
1.3 JUSTIFICACIÓN	10
CAPÍTULO II	
2.1 OBJETIVO GENERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
CAPÍTULO III	
3.1 MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.2 REACTIVOS	12
3.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA	13
3.2.2 AMPLIFICACIÓN	13
3.2.3 DIGESTIONES	13
3.2.4 GELES DE POLIACRILAMIDA	13
3.3 EQUIPO	14
3.4 MÉTODOS	15
3.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA	16
3.4.2 AMPLIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN <i>Timidilato Sintasa</i>	18
3.4.3 CULTIVO CELULAR DE HT-29 y AGS	19
3.4.4 CLONACIÓN DE <i>TS2</i> Y <i>TS 3</i>	19
3.4.5 TRANSFECCIÓN	22
3.4.6 ENSAYO DE LUCIFERASA	23

3.4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
CAPÍTULO IV	
4.1 RESULTADOS	24
4.1.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE REPETICIONES EN TANDEM EN LA REGIÓN 5-UTR DE <i>TS</i> .	25
4.1.2 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL GENOTIPO <i>TS</i> EN BASE AL NÚMERO DE REPETICIONES.	26
4.1.3 FRECUENCIA ALÉLICA DE LAS VARIANTES 2R Y 3R EN CÁNCER GASTROINTESTINAL.	28
4.1.4 DIGESTIÓN DE LOS AMPLICONES <i>TS</i> CON LA ENZIMA <i>HAEIII</i> .	29
4.1.5 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL GENOTIPO <i>TS</i> EN BASE AL NÚMERO DE REPETICIONES Y SNP.	30
4.1.6 CLASIFICACIÓN DE GENOTIPOS EN BASE A LA RESPUESTA A 5-FLUOROURACILO.	31
4.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	32
4.2.1 RHO DE SPEARMAN PARA DATOS NO PARAMÉTRICOS- <i>CÁNCER DE COLON</i> .	33
4.2.2 RHO DE SPEARMAN PARA DATOS NO PARAMÉTRICOS- <i>CÁNCER DE ESTÓMAGO</i> .	34
4.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN BASE AL ESTADÍO DE LA ENFERMEDAD.	35
4.3 CLONACIÓN DE LAS VARIANTES 2C Y 3G EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN SV40-PGL3.	36
4.3.1 ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN EN LAS LÍNEAS CELULARES DE HT-29 Y AGS.	37
CAPÍTULO V	
5.1 DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO VI	
6.1 CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

No	TÍTULO	PÁGINA
Tabla I.	Clasificación de estadios.	2
Tabla II.	Variables demográficas del grupo de cáncer de colon.	23
Tabla III.	Variables demográficas del grupo de cáncer de estómago.	23
Tabla IV.	Frecuencia alélica de las variantes 2R y 3R de <i>TS</i> .	27
Tabla V.	Clasificación de genotipos en base a la respuesta al tratamiento con 5-FU.	30
Tabla VI.	Asociación entre genotipo y número de núcleos positivos para <i>TS</i> en cáncer de colon.	32
Tabla VII.	Asociación entre genotipo y número de núcleos positivos para <i>TS</i> en cáncer de estómago.	33
Tabla VIII.	Clasificación de los resultados de la Inmunohistoquímica en base a el estadio de la enfermedad.	34
Tabla IX.	ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular HT-29.	37
Tabla X.	ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 48 h post-transfección en la línea celular HT-29.	38
Tabla XI.	ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular AGS.	39
Tabla XII.	ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 48 h post-transfección en la línea celular AGS.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

No	TÍTULO	PÁGINA
Figura I.	Metabolitos formados a partir del 5-Fluorouracilo.	4
Figura II.	Papel de los metabolitos de 5-FU.	5
Figura III.	Esquema del gen <i>TS</i> .	6
Figura IV.	Variantes alélicas de <i>TS</i> .	7
Figura V.	Productos amplificados de 119 y 147 pb del gen <i>TS</i> .	24
Figura VI.	Productos amplificados de 119 y 147 pb del gen <i>TS</i> .	24
Figura VII.	Distribución porcentual de genotipo en base al número de repeticiones en cáncer gastrointestinal.	25
Figura VIII.	Distribución porcentual de genotipo en base al número de repeticiones en cáncer de colon.	25
Figura IX.	Distribución porcentual de genotipo en base al número de repeticiones en cáncer de estómago.	26
Figura X.	Productos amplificados digeridos con <i>HaeIII</i> .	28
Figura XI.	Productos amplificados digeridos con <i>HaeIII</i> .	28
Figura XII.	Distribución porcentual de genotipo en base al número de repeticiones y SNP en cáncer de colon.	29
Figura XIII.	Distribución porcentual de genotipo en base al número de repeticiones y SNP en cáncer de estómago.	29
Figura XIV.	Control positivo para los ensayos de inmunohistoquímica.	31

Figura XV.	Imunohistoquímica de tejido tumoral de colon.	32
Figura XVI.	Vector SV40-PGL3 e inserto 3G con sitios de restricción <i>HindIII-NcoI</i> .	35
Figura XVII.	Caracterización de las variantes 2C y 3G clonadas en SV40-PGL3, mediante PCR y digestión con la enzima <i>HaeIII</i> .	36
Figura XVIII.	Ensayos de transfección.	36
Figura XIX.	Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular HT-29.	37
Figura XX.	Ensayo de Luciferasa a las 48 h post-transfección en la línea celular HT-29.	38
Figura XXI.	Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular AGS.	39
Figura XXII.	Ensayo de Luciferasa a las 48 h post-transfección en la línea celular AGS.	40

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
h	Hora
Kb	Kilobase
M	Molar
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio

seg	Segundos
UTR	Región no traducible
UV	Ultravioleta
VNTR's	Número variable de repeticiones en tandem

CAPÍTULO I

1.1 RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UANL

Presenta: Q.F.B. Clara Patricia Ríos Ibarra

Título del Estudio: ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO Y FUNCIONAL DEL GEN
Timidilato Sintasa EN CÁNCER GASTROINTESTINAL

Introducción. El agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo (5-FU) tiene como blanco a la enzima Timidilato Sintasa. Una mutación contenida en la región 5'-UTR del gen *Timidilato Sintasa* (VNTR's) se ha correlacionado con un incremento en la eficiencia de traducción de los RNAm de *TS* dando como resultado niveles elevados de proteína TS. En otras poblaciones se ha reportado que una alta cantidad de la enzima esta asociada con una pobre respuesta al tratamiento con 5-FU en pacientes con cáncer.

Objetivos. (1) Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los VNTR's de *TS* en pacientes con cáncer gastrointestinal; (2) determinar si existe asociación entre el genotipo y la presencia de la proteína y (3) observar el comportamiento de las variantes 2C y 3G de *TS* sobre la expresión de un gen reportero en las líneas celulares HT-29 y AGS.

Material y Métodos. Se seleccionaron 46 muestras de cáncer gastrointestinal de pacientes que habían recibido tratamiento adyuvante con 5-FU, de las cuales 19 correspondían a cáncer de colon y 27 a cáncer de estómago. Los VNTR's de *TS* se evaluaron mediante PCR y digestión con enzimas de restricción.

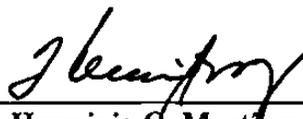
Se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para identificar el número de núcleos positivos para TS en las muestras de cáncer gastrointestinal.

Las variantes 2C y 3G de *TS* fueron clonadas en el vector comercial SV40-PGL3-Luc y con el vector resultante se hicieron ensayos de transfección en las líneas celulares HT-29 (cáncer de colon) y AGS (cáncer de estómago).

Resultados. En 46 muestras de cáncer gastrointestinal el alelo 3R tuvo una frecuencia de 0.73 y el alelo 2R de 0.27. En el grupo con respuesta completa el genotipo predominante en un 70% fue heterocigoto: 2R/3R, mientras que en el grupo con respuesta parcial el genotipo estuvo representado por la forma 3R/3R en un 100%.

No se encontró asociación entre la presencia de la proteína y el genotipo ($p > 0.05$). Los ensayos de transfección mostraron una mayor señal de Luciferasa en las células HT-29 y AGS que contenían la variante 2C ($p < 0.05$).

Conclusiones. El alelo 3R fue predominante en las muestras de cáncer gastrointestinal. Para definir con mayor especificidad la relación entre genotipo y proteína TS se sugiere realizar ensayos enzimáticos o moleculares a partir de tejido fresco. El resultado del análisis funcional en las líneas celulares HT-29 y AGS es diferente a lo reportado en células HeLa.



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Director de Tesis

1.2 INTRODUCCIÓN

1.2.1 CÁNCER GASTROINTESTINAL

A nivel mundial las neoplasias más frecuentes de aparato digestivo son el cáncer de estómago y colon. En el año 2004 el INEGI reportó que los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México, lo cual representa el 12.9% del total de las defunciones registradas.

En nuestro país la distribución porcentual de las defunciones por cáncer de estómago y colon en los hombres corresponde a: 9.4% para cáncer de estómago y 4.1% para cáncer de colon; en las mujeres 7.8% para cáncer de estómago y 4.2% para cáncer de colon (INEGI, 2004).

La recuperación de un paciente con cáncer gastrointestinal, depende directamente de la extensión del tumor y del compromiso de ganglios (Adachi, 2000).

La cirugía representa la forma estándar de terapia con finalidades curativas. Sin embargo, continúa siendo insuficiente esta estrategia, sobre todo si hay presencia de tumores secundarios ó micrometástasis, por lo que se ha optado por la terapia adyuvante (Gunderson, 1982), la cual involucra quimioterapia o radioterapia; desafortunadamente la terapia adyuvante no ha repercutido significativamente en los patrones generales de supervivencia. (Chang, 2002).

La clasificación del cáncer puede hacerse en base a su tipo histológico, a su localización y de acuerdo a la extensión del tumor primario (T), compromiso ganglionar linfático (N) y presencia de metástasis (M).

En la siguiente tabla se muestra la clasificación de los estadios de cáncer gastrointestinal considerando las características descritas para T, N y M.

Tabla I. Clasificación de los tumores gastrointestinales por estadios.

ESTADIO 0	<i>Tis</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
ESTADIO IA	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
ESTADIO IB	<i>T1</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>

	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
ESTADIO II	<i>T1</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
	<i>T2</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
ESTADIO IIIA	<i>T2</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
	<i>T3</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T4</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
ESTADIO IIIB	<i>T3</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
ESTADIO IV	<i>T1,T2,T3</i>	<i>N3</i>	<i>M0</i>
	<i>T4</i>	<i>N1,N2,N3</i>	<i>M0</i>
	<i>Cualquier T</i>	<i>Cualquier N</i>	<i>M1</i>

TUMOR PRIMARIO. Tx: el tumor primario no puede ser investigado; T0: no hay evidencias de tumor primario; Tis: carcinoma in situ (tumor intraepitelial, sin invasión de la lámina propia); T1: el tumor compromete la lámina propia o submucosa; T2: el tumor infiltra la muscular propia o la subserosa; T3: el tumor penetra la serosa; T4: el tumor infiltra estructuras vecinas. **COMPROMISO LINFÁTICO REGIONAL.** N0: los linfonodos regionales no se pueden investigar; N1: metástasis en 1-6 linfonodos; N2: metástasis en 7-15 linfonodos; N3: metástasis en más de 15 linfonodos. **METÁSTASIS A DISTANCIA.** Mx: las metástasis no se pueden investigar; M0: no hay metástasis a distancia; M1: hay metástasis. (Irvin, 1998).

1.2.2 FARMACOGENÉTICA

Con el reciente progreso de la biología molecular y la secuenciación del genoma humano, han surgido 2 nuevas ramas de la farmacología: farmacogenética y farmacogenómica, las cuales buscan el entendimiento de la respuesta de un individuo a un tratamiento químico en base a su genotipo y el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento contra el cáncer (Lee, 2005). La farmacogenética estudia la correlación entre las mutaciones genéticas y los diferentes patrones de expresión con respecto a la susceptibilidad o resistencia a diversos factores químicos, mientras que en la farmacogenómica se identifican blancos de DNA/RNA para el desarrollo de nuevos fármacos (Lenz, 2004).

El análisis farmacogenético implica la observación de variaciones en el material genético como lo son: SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), rearrreglos cromosómicos, deleciones o duplicaciones que influyen en la expresión de un gen; la

caracterización de estas alteraciones son de gran utilidad para identificar sujetos con alto riesgo de desarrollar toxicidad o resistencia a un principio activo (Di Paolo, 2004).

1.2.3 5-FLUOROURACILO

Un gran número de factores moleculares están implicados en la sensibilidad de un individuo para responder a drogas anti-cáncer (Tahara, 2003). La fluoropirimidina 5-Fluorouracilo es una de las drogas prescritas con mayor frecuencia para el tratamiento contra el cáncer gástrico, colorrectal, de mama, cabeza y cuello (Kuilenburg, 2004). El 5-Fluorouracilo combinado con otros agentes quimioterapéuticos, como el ácido folínico e irinotecan, incrementa su efectividad (Teqze, 2006); sin embargo la respuesta total al tratamiento del cáncer con 5-FU no es mayor al 25% (Jakobsen, 2005).

El 5-Fluorouracilo es un análogo del uracilo con un átomo de flúor en lugar de un hidrógeno en la posición C-5. El 5-Fluorouracilo es convertido intracelularmente a diversos metabolitos activos: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluouridina trifosfato (FUTP) (Longley, 2003). (Fig.1)

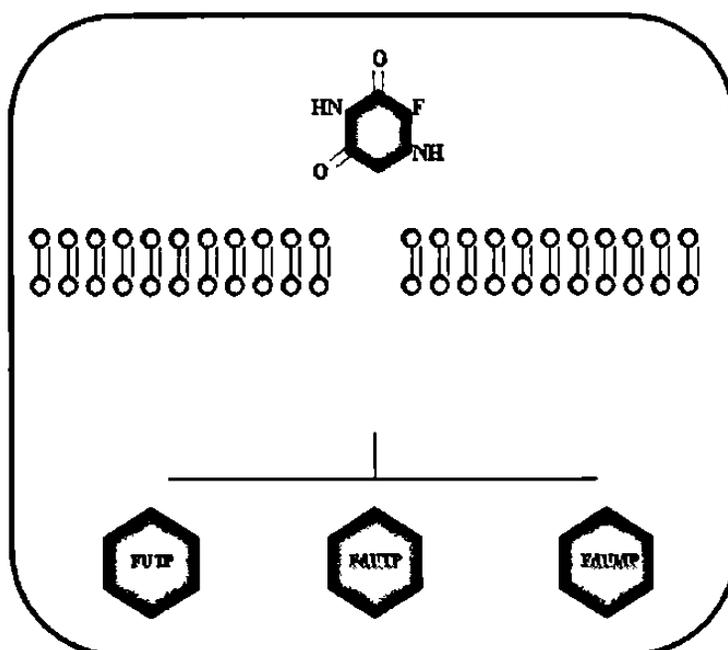


Figura 1. Metabolitos formados a partir del 5-Fluorouracilo. 5-FU, 5-Fluorouracilo; FdUMP, Fluorodesoxiuridina monofosfato; FdUTP, Fluorodesoxiuridina trifosfato; FUTP, Fluorodesoxiuridina trifosfato

Los metabolitos formados a partir del 5-FU interfieren con el metabolismo de la célula de diferentes maneras, el FdUMP inhibe la actividad de TS al desplazar y ocupar el sitio de unión a la enzima TS de dUMP que es el sustrato natural (Gmeiner WH, 2005); además, debido a que los metabolitos FUMP y FdUTP pueden insertarse en los ácidos nucleicos, el correcto funcionamiento de los eventos de replicación, reparación y transcripción son bloqueados; estas alteraciones en conjunto conducen a muerte celular (Pinedo, 1988) (Figura II.).

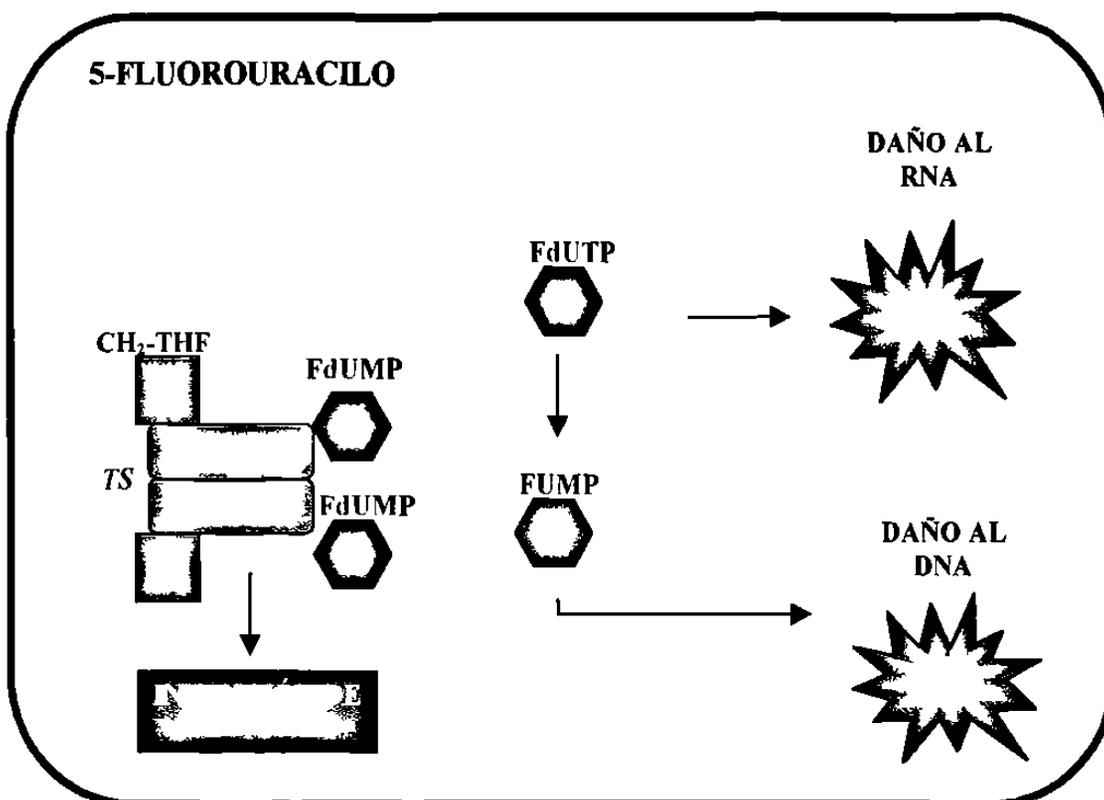
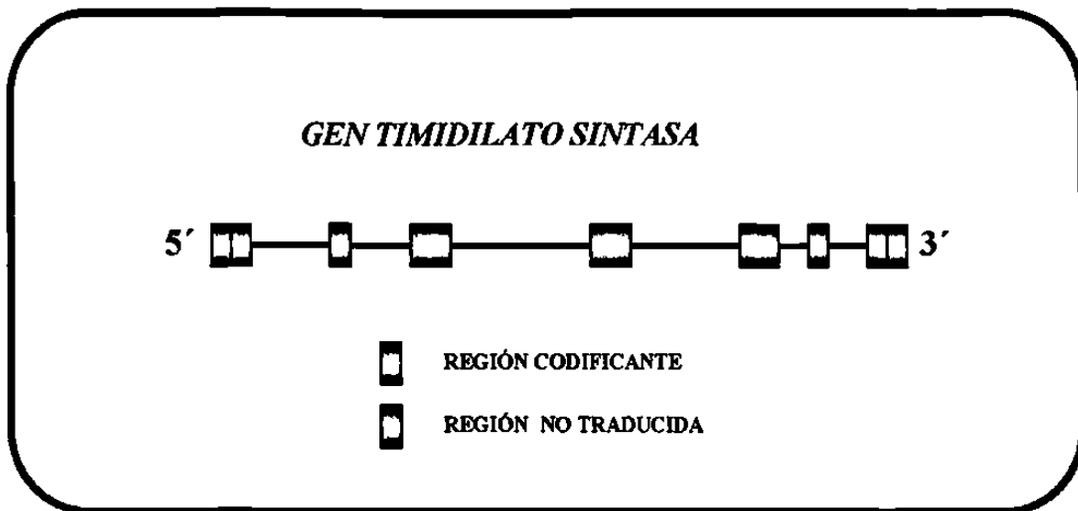


Figura II. A. FdUMP se une a TS y CH₂THF con lo que bloquea la actividad de la enzima. FdUTP se incorpora al RNA impidiendo su procesamiento. FUMP se añade al DNA interfiriendo su replicación o reparación. En conjunto estas alteraciones inducen apoptosis.

Diversas enzimas están implicadas en la sensibilidad al tratamiento con 5-FU como lo son: timidilato sintasa, dihidropirimidina deshidrogenasa, metilentetrahidrofolato reductasa y timidina fosforilasa (Ciaparrone, 2006); los genes que codifican para estas enzimas presentan polimorfismos o mutaciones que pueden influir en el metabolismo del agente quimioterapéutico y su toxicidad (Amatori, 2006).

1.2.4 TIMIDILATO SINTASA

La enzima Timidilato Sintasa (TS) es un importante blanco quimioterapéutico para 5-FU; TS cataliza la metilación reductiva de dUMP por medio de 5,10-metilentetrahidrofolato a la forma dTMP y dihidrofolato (Kawakami, 2001).



NCBI: OMIM *188350

Figura III. Esquema del gen Timidilato sintasa. Está conformado por 7 exones, 6 intrones y extremos 5' y 3' UTR.

El gen que codifica para *Timidilato Sintasa (TS)* está constituido por 7 exones y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 18 bandas 1.32 (18p1.32); el RNAm de *TS* tiene un número variable de repeticiones en tandem (VNTRs) en la región 5'-UTR (Kawakami, 2003)(figura III); las secuencias repetidas constan de 28 pb, cada repetición tiene la siguiente secuencia nucleotídica: **CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG**; regularmente el número de repeticiones suelen ser 2 (TS2), 3 (TS3), 5 o inclusive 9; estudios previos sugieren que las secuencias repetidas en *TS* juegan un papel importante en el control de su expresión y además son variantes génicas que pueden predecir la efectividad de 5-FU (Longley, 2003).

Otros estudios han demostrado que la forma homocigota TS3/TS3 expresa niveles hasta 3 veces mayores de RNAm de *TS* comparado con la forma TS2/TS2 (Lecomte, 2004); los niveles de RNAm de *TS* constituyen una buena alternativa para evaluar el pronóstico de los pacientes que reciben el tratamiento adyuvante con 5-FU (Fujiwara, 2002). Ahora

bien, es importante señalar que existen reportes contradictorios con respecto a la relación entre los niveles de RNAm de *TS* y la respuesta a 5-FU; Kawakami (Japón) en el año 2003 reportó que los individuos con altos niveles de RNAm de *TS* obtienen menos beneficios con la quimioterapia basada en 5-FU, mientras que Kornman (Alemania) en el mismo año asoció altos niveles de RNAm de *TS* con una mejor respuesta al tratamiento con 5-FU (Kornman, 2003); esta diferencia podría deberse a que utilizaron diferentes medios para llegar a una conclusión; en el primer caso, se hizo un análisis funcional en células HeLa de *TS* utilizando vectores que contenían la secuencia TS2 o TS3 y observaron una mayor expresión en la forma TS3; estos resultados los asociaron con datos clínicos y se percataron, que los pacientes con genotipo TS2/TS2 responden mejor al tratamiento con 5-FU. En el segundo caso, se determinaron niveles de expresión de los RNAm de *TS*, utilizando tejido embebido en parafina y de cada muestra recuperaron una alícuota de diferentes partes del tumor; el haber utilizado tejido embebido en parafina genera incertidumbre, debido a que el RNA suele encontrarse parcialmente degradado bajo esta condición, sin embargo, ellos correlacionaron sus resultados con la respuesta al tratamiento con 5-FU y concluyeron que los pacientes TS2/TS2 sobreviven menos tiempo que aquellos individuos con genotipo TS3/TS3.

Recientemente se descubrió la presencia de un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido G>C) en las secuencias repetidas en *TS* (Kawakami, 2003); este polimorfismo modifica la actividad traduccional de *TS* siendo 3 veces mayor la actividad en la forma alélica 3G que en los alelos 2C, 2G y 3C, por lo que se han clasificado como genotipos de baja expresión a 2R/2R, 2R/3C, 3C/3C y como genotipos de alta expresión a 2R/3G 3C/3G y 3G/3G (Yawata, 2005) (Figura IV).

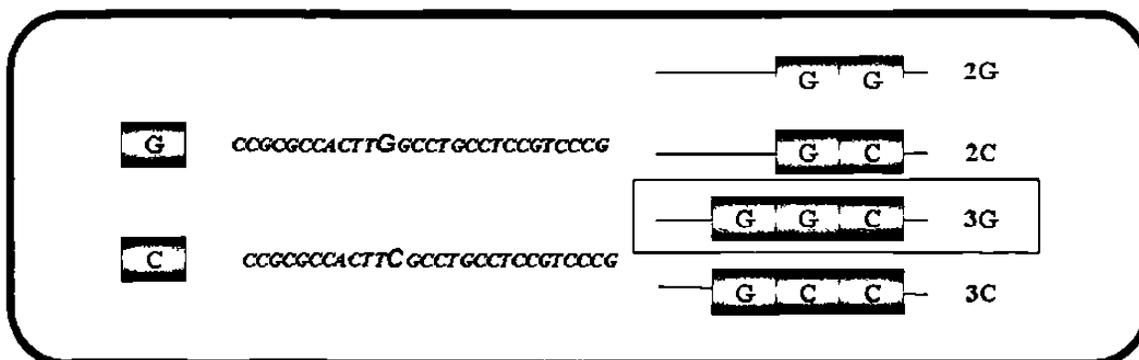


Figura IV. En base a la presencia o ausencia del SNP (G-C) en los VNTR's de *TS* se forman cuatro variantes alélicas: 2G, 2C, 3G y 3C.

Por otra parte, la región 3'-UTR de *TS* presenta un polimorfismo de 6pb, el cual está conformado por la siguiente secuencia: *TTAAAG*. Si el gen alberga esta secuencia de 6 pares de bases se le denomina alelo I, si carece de ella se le nombra alelo D. La estabilidad de los RNAm de *TS* también se han asociado a este polimorfismo, ya que se observa una menor cantidad de RNA en muestras provenientes de sujetos con condición homocigota para el alelo D (Pullman, 2005).

1.2.5 DIHIDROPIRIMIDINA DESHIDROGENASA

Más del 80% del 5-FU es catabolizado por la enzima Dihidropirimidina Deshidrogenasa (DPD), esto sugiere que en los pacientes con una deficiencia en esta enzima se incrementa el riesgo de desarrollar una severa toxicidad asociada a 5-FU (van Kuilenburg, 2001).

El gen que codifica DPD está en el cromosoma 1p22 y está constituido por 23 exones. Se han identificado diversas mutaciones relacionadas con la alteración en el splicing del pre-RNAm o la función de la enzima DPD (van Kuilenburg, 2005). La mutación más característica en un punto de procesamiento en DPD es: IVS4 + G>A; esta mutación se presenta en el punto de unión entre el exón y el intrón 14; como resultado de la mutación, se obtiene un RNAm de DPD, que carece de un segmento de 165 nucleótidos que codifica los aminoácidos 581-635, lo que genera una proteína inactiva (van Kuilenburg, 2001).

1.2.6 METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA

La enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la conversión irreversible de 5-10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato lo cual es indispensable en la vía de síntesis de DNA para actuar como un cofactor en la conversión de desoxiuridina monofosfato a desoxitimidina monofosfato; esto a su vez favorece la unión de 5-fluorodesoxiuridina monofosfato a *TS* para su inhibición (Ko, 2006).

Los polimorfismos MTHFR 677CT y MTHFR 1298 AC generan una enzima con actividad deficiente, por lo que aquellos pacientes que presenten uno de estos polimorfismos responden mejor al tratamiento con 5-FU (Jakobsen, 2005).

1.2.7 TIMIDINA FOSFORILASA

La timidina fosforilasa cataliza la conversión reversible de 5-FU a fluorodesoxiuridina, el cual puede ser convertido al metabolito activo FdUMP. La sobre-expresión de TP disminuye la respuesta a 5-FU (Longley, 2003).

Recientemente se reportó que si se investiga la expresión de Timidilato Sintasa, Dihidropirimidina Deshidrogenasa y Timidina Fosforilasa, puede realizarse una mejor predicción de la respuesta que tendrá un paciente al tratamiento con 5-FU (Salonga, 2000).

Aplicar la Farmacogenética a la terapia del cáncer es importante, ya que los fármacos implicados en la quimioterapia tienen un rango muy estrecho entre efectividad y toxicidad, además de que si el médico conoce como reaccionará el paciente a un tratamiento puede elegir un esquema de medicamentos más efectivo y menos tóxico, pudiendo idealmente diseñar tratamientos individualizados a la medida de cada una de las enfermedades.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En nuestra población no se conoce la frecuencia genotípica de *TS* en pacientes con cáncer gastrointestinal.

Ya que los niveles de *TS* están relacionados con la resistencia a 5-FU, es importante realizar ensayos para determinar la frecuencia genotípica de *TS* y sus niveles de proteína, que le permitan al médico predecir la respuesta a 5-FU y así elegir la mejor estrategia para el tratamiento de pacientes con cáncer gastrointestinal.

CAPITULO II

2.1 OBJETIVO GENERAL

Asociar el genotipo y la presencia de proteína de *TS* en pacientes con cáncer gastrointestinal con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico con 5-FU

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Correlacionar el genotipo de *TS* en pacientes con cáncer gastrointestinal con la respuesta al tratamiento con 5-FU.
- II. Asociar la presencia de la proteína *TS* con el genotipo y el estadio de la enfermedad.
- III. Analizar el efecto de las repeticiones en tandem de *TS* sobre la expresión de un gen reportero en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y de cáncer de estómago AGS.

CAPITULO III

3.1 MATERIAL Y METODOS

3.1.1 TIPO DE ESTUDIO

Retrospectivo, transversal, comparativo y experimental.

El estudio fue aprobado el 03 de Abril de 2006 por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, el cual quedó registrado con la clave 6I06-011.

3.1.2 UNIVERSO DEL ESTUDIO

Tejido tumoral embebido en parafina de pacientes con cáncer gástrico ó cáncer de colon almacenados en el Departamento de Anatomía y Patología del Hospital Universitario de la UANL en el periodo de Enero de 1998-Enero de 2005.

3.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Tejido tumoral embebido en parafina, de pacientes con cáncer gástrico ó cáncer de colon que hayan recibido tratamiento con 5-FU.

3.1.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Tejido tumoral embebido en parafina de pacientes con cáncer gástrico ó cáncer de colon que no hayan recibido tratamiento con 5-FU.

Tejido embebido en parafina en mal estado o muestras para uso diagnóstico.

3.2 REACTIVOS

3.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Los solventes fueron adquiridos de la casa comercial Merck® (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA) y Sigma Chemical Co (St, Louis, MO, EUA).

Los reactivos utilizados en la extracción de DNA fueron los siguientes:

Proteinasa K
Fenol/Cloroformo
Etanol 100%
Etanol 70%
H₂O mili Q

3.2.2 AMPLIFICACIÓN

Los reactivos utilizados en las reacciones de PCR fueron adquiridos en Promega Corporation (Madison, WI, EUA) y GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA):

Taq pol	5U/ μL
MgCl₂	25 mM
dNTP's	10 mM
DMSO	100%
Buffer	10X

3.2.3 DIGESTIONES

Las enzimas de restricción empleadas fueron adquiridas de New England Biolabs Inc (Beverly, MA, EUA).

<i>HaeIII</i>	10U/ μL
<i>HindIII</i>	20U/ μL
<i>NcoI</i>	10U/ μL

3.2.4 GELES DE POLIACRILAMIDA

Para la preparación de los geles de poliacrilamida se utilizó bisacrilamida y PSA de la Casa Comercial Sigma Chemical Co (St, Louis, MO, EUA):

3.2.5 CULTIVO CELULAR

Medio DMEM (GIBCO-BRL), Suero Bovino Fetal (Hyclone), Penicilina, Estreptomicina (Lifeside)

3.2.6 CULTIVO CELULAR

LB (Becton Dickinson), Agar (Sigma Chemical Company), (Extracto de Levadura LB (Becton Dickinson), Vector PGL-3 (Promega)

3.2.7 TRANSFECCIÓN

Lipofectamina (Invitrogen), Medio DMEM (GIBCO-BRL)

3.2.7 ANÁLISIS FUNCIONAL

Sustrato de Luciérnaga (Promega), Sustrato de Renilla (promega).

3.3 EQUIPO

- Microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C
- Incubadora Shel-Lab
- Horno de Microondas modelo MA-857 M
- Termomixer eppendorf modelo 5436
- Balanza Digital modelo 1206 MP
- Cámara de Electroforesis Vertical con fuente de poder de Bio-Rad Life Science Research Products.
- Cámara de Electroforesis Horizontal con fuente de poder de Bio-Rad Life Science Research Products.
- Termociclador de la casa comercial Applied Biosystems.
- Campana de Cultivo Celular
- Transiluminador UV Upland, CA, EUA.
- Luminómetro Turner Biosystems

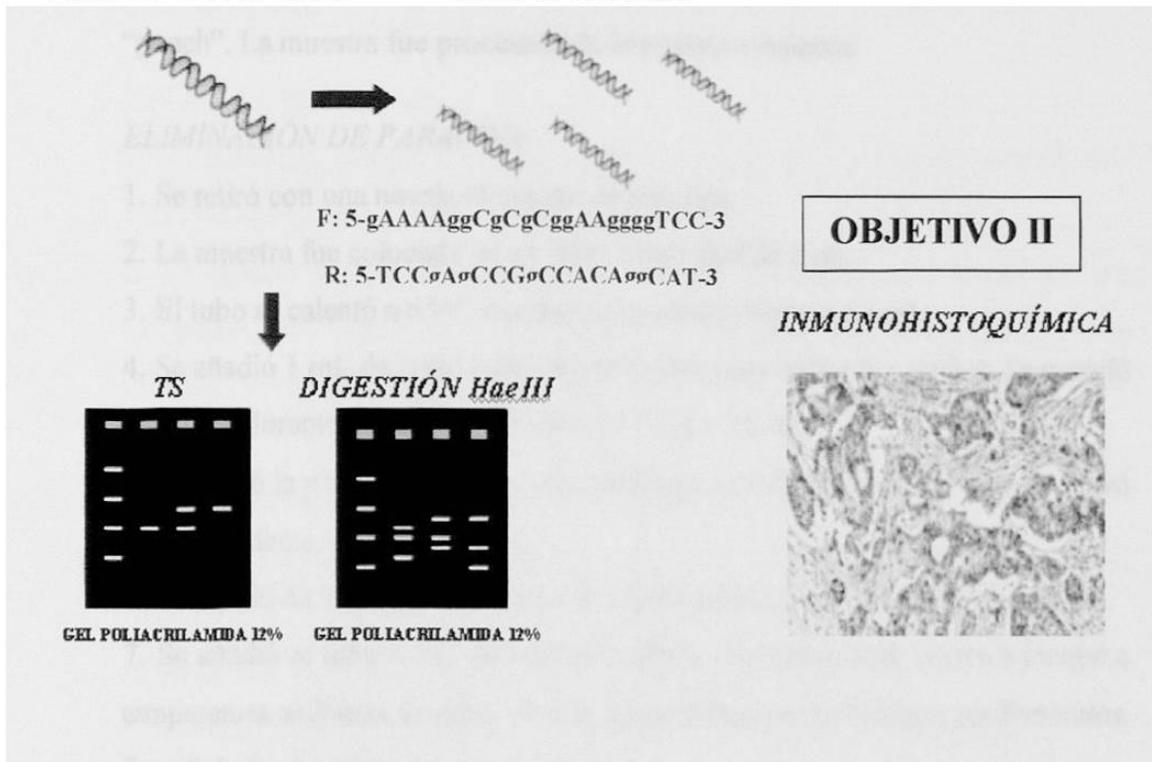
3.4 MÉTODOS

ESTRATEGIA GENERAL

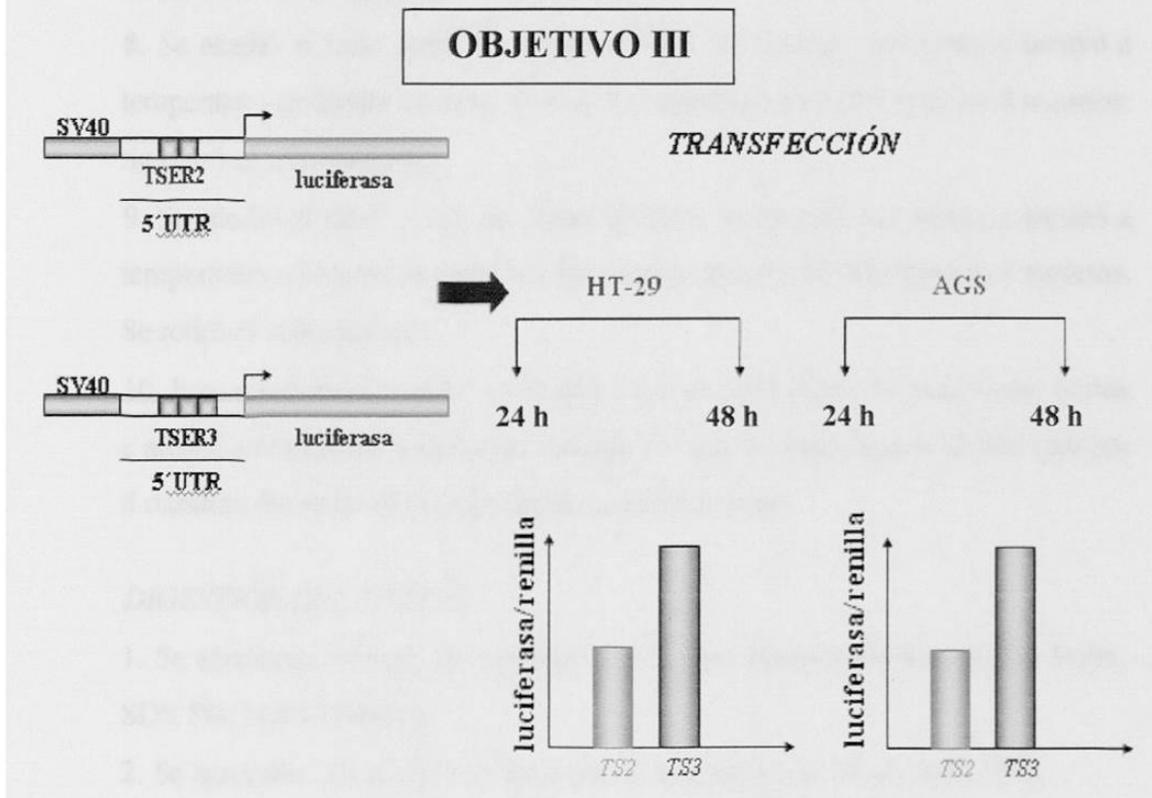
OBJETIVO I

EXTRACCIÓN DE DNA

AMPLIFICACIÓN



OBJETIVO III



3.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Biopsias y tejido embebido en parafina:

El Dr. Juan pablo Flores, del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la UANL seleccionó la porción de la muestra embebida en parafina donde solo se encontraba tejido tumoral y fue tomada mediante un "punch". La muestra fue procesada de la siguiente manera:

ELIMINACIÓN DE PARAFINA

1. Se retiró con una navaja el exceso de parafina.
2. La muestra fue colocada en un tubo eppendorf de 2 mL.
3. El tubo se calentó a 65°C durante 10 minutos (thermomixer).
4. Se añadió 1 mL de Xilol (solvente no polar) para retirar la parafina. Se mezcló en vortex durante 3 min y se incubó a 55°C por 15 min.
5. Se liberó la presión del tubo y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante.
6. Se repitió de 2-3 veces los pasos 3-5 hasta retirar completamente la parafina.
7. Se añadió al tubo 1 mL de etanol al 100%. Se mezcló con vortex e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante.
8. Se añadió al tubo 1 mL de etanol al 70%. Se mezcló con vortex e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante.
9. Se añadió al tubo 1 mL de etanol al 30%. Se mezcló con vortex e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante.
10. Para rehidratar el tejido se añadió 1 mL de H₂O miliQ Se mezcló con vortex e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente.

DIGESTIÓN DEL TEJIDO

1. Se añadieron 400 µL de solución de lisis (tris 100mM pH 8.8, EDTA 5mM, SDS 5%, NaCl 100mM)
2. Se agregaron 50 µL de Proteinasa K (10mg/mL) y 20 µL de SDS 10%.

3. Se mezcló en vortex e incubó a 48°C toda la noche (si el tejido no se digería totalmente se añadían 20 µL más de Proteinasa K e incubaba 2-3 h)

NOTA: Para digerir el tejido se utilizó la enzima Proteinasa K, ya que lisa membranas e inactiva endonucleasas como lo son las DNAsas o RNAsas.

4. Una vez digerido el tejido se inactivó la enzima con una incubación a 95°C durante 10 min.

EXTRACCIÓN DE DNA

1. Se añadieron 500 µL de fenol. Se mezcló en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante.

2. Se añadieron 250 µL de fenol y 250 µL de sevag (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1). Se mezcló con vortex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante.

3. Se añadieron 500 µL de sevag. Se mezcló con vortex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante.

4. Se agregaron 0.33 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100%.

5. Se incubó a -70°C durante 3 h o bien toda la noche.

6. Se centrifugó a 14,000rpm por 20 minutos. Se decantó sobrenadante.

7. Se añadió 1 volumen de etanol al 70%.

8. Se centrifugó a 14,000rpm por 20 minutos. Se decantó sobrenadante.

9. Se dejó secar la pastilla.

10. Se resuspendió la pastilla en 20-50 µL de H₂O miliQ.

3.4.2 AMPLIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN *TIMIDILATO SINTASA*

La región polimórfica *TS2* y *TS3* del gen *Timidilato Sintasa* fue amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el oligonucleótido sentido 5'-gAAAaggCgCGCggAAggggTCC-3' y el oligonucleótido anti-sentido 5'-TCCGAgCCggCCACAggCAT-3'

REACTIVOS	VOLUMEN
Buffer 10X	2.5 µL
<i>TS</i> sentido 5 µM	2.0 µL
<i>TS</i> anti-sentido 5 µM	2.0 µL
dNTP's 10mM	0.5 µL
DMSO	2.0 µL
MgCl ₂ 25mM	0.75 µL
H ₂ O miliQ	13.75 µL
<i>Taq pol</i>	0.50 µL
DNA	1.0 µL

La amplificación se realizó en 35 ciclos; cada ciclo consistió en 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 68°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%; los homocigotos para las repeticiones *TS2* generaron un producto de 119pb, los homocigotos para las repeticiones *TS3* de 147pb y los heterocigotos *TS2/TS3* de 147 y 119pb.

**3.4.2.1 DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS
CON LA ENZIMA *HaeIII***

REACTIVOS	VOLUMEN
<i>HaeIII</i> 10U/ μ L	1.0 μ L
Buffer 10X	1.5 μ L
H ₂ O miliQ	4.0 μ L
DNA 200ng	8.5 μ L

3.4.3 CULTIVO CELULAR DE HT-29 y AGS

Las células fueron cultivadas en medio OPTI-MEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 10% de CO₂ y 90% de aire. Las células HT-29 fueron donadas por el CINVESTAV de la ciudad de México y las células AGS por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

3.4.4 CLONACIÓN DE *TS2* Y *TS3*

Las variantes 2C y 3G de *TS* se amplificaron utilizando un juego de oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *NcoI*. Los fragmentos digeridos se ligaron en el vector SV40-PGL3.

AMPLIFICACIÓN

1. La región polimórfica *TS2* y *TS3* del gen *Timidilato Sintasa* fue amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el oligonucleótido sentido 5'-*G TTCATAAGCTTGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTCC-3'* (*HindIII*) y el oligonucleótido anti-sentido 5'-*CTAGAACCATGGTCCGAGCCGGCCACAGGCAT-3'* (*NcoI*)

REACTIVOS	VOLUMEN
Buffer 10X	2.5 μ L

<i>TS</i> sentido 5 μ M	2.0 μ L
<i>TS</i> anti-sentido 5 μ M	2.0 μ L
dNTP's 10mM	0.5 μ L
DMSO	2.0 μ L
MgCl ₂ 25mM	0.75 μ L
H ₂ O miliQ	13.75 μ L
<i>Taq pol</i>	0.50 μ L
DNA	1.0 μ L

2. La amplificación se realizó en 35 ciclos; cada ciclo consistió en 1 min a 94°C, 30 seg a 45°C y 30 seg a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C.

DIGESTIÓN

1. El vector SV40-PGL3 contiene los sitios *HindIII* y *NcoI* entre el promotor SV40 y el gen reportero de Luciferasa. Tanto el vector como los insertos fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *NcoI*.

REACTIVOS	VOLUMEN
<i>HindIII</i> 20U/ μ L	1.0 μ L
<i>NcoI</i> 10U/ μ L	1.0 μ L
Buffer 10X	1.5 μ L
H ₂ O miliQ	4.0 μ L
DNA 200ng	7.5 μ L

LIGACIÓN

REACTIVOS	VOLUMEN
Vector 1µg/µL	0.5 µL
Inserto 200 ng/ µL	5.0 µL
Buffer 10X	1.5 µL
Ligasa	1.0 µL
H2O miliQ	6.0 µL
ATP	1.0 µL

TRANSFORMACIÓN

1. Se añadieron 100µL de células calcio competentes (*XL-BLU*) a 15 µL del producto de la ligación.
2. Se incubó en hielo durante 30 min.
3. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 seg sin agitar (thermomixer).
4. Se incubó 10 min en hielo.
5. Se agregaron 100 µL de medio LB.
6. Se incubó 1 hr a 37°C (thermomixer ó incubadora).
7. Se realizó un spin de 7 seg.
8. Se retiraron 120 µL de sobrenadante.
9. Se resuspendió la pastilla en el medio residual, para después sembrar la suspensión en cajas petri con medio LB-agar y ampicilina 1X.
10. Se incubó a 37°C 12 h.

SELECCIÓN DE LAS COLONIAS Y AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

1. Se aislaron las colonias blanco mediante picadura para después inocular 15 mL de medio LB.
2. Se incubó 12-18 hrs a 37°C con agitación.
3. Se centrifugó a 5000rpm durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante.

4. Se resuspendió la pastilla con 150 μ L de Solución I. La suspensión se recuperó y colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL
5. Se añadieron 300 μ L de solución II. Se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Se añadieron 225 μ L de solución III. Se mezcló por inversión. Se incubó en hielo durante 5 min.
7. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min. Se recuperó el sobrenadante.
8. Se añadieron 800 μ L de isopropanol (0.6 volúmenes). Se mezcló por inversión e incubó 5 min en hielo.
9. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante.
10. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%. Se centrifugó 1 min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla.
11. El DNA se resuspendió en 100 μ L de H₂O miliQ

3.4.5 TRANSFECCIÓN

Para introducir el vector de expresión en las células HT-29 y AGS se utilizó la técnica de lipofección, la cual consiste en formar complejos lipofectamina-DNA (Invitrogen). Para cada transfección se prepararon dos soluciones, la primera contenía 2ng de plásmido control y 200ng del plásmido a analizar en medio sin suero ni antibióticos a temperatura ambiente pH 7.3; la segunda dilución contenía 5 μ l de lipofectamina y 1 μ l de reactivo plus en 96 μ l de medio sin suero ni antibióticos; ambas soluciones se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los complejos formados fueron adicionados a las cajas que contenían las células HT-29 ó AGS y la incubación se realizó a 37°C en una incubadora de CO₂.

1. Se cultivaron 25,000 células HT-29 y 15, 000 células AGS por pozo, en una placa de 96 pozos. Las células alcanzaron una confluencia del 80% 12 hrs después de ser sembradas.
2. Se prepararon dos soluciones, la primera contenía 200 ng de plásmido problema, 2 ng de plásmido renilla y medio sin suero ni antibiótico. La segunda solución contenía 0.3 μ L de lipofectamina y medio sin suero ni antibiótico.

3. Se mezclaron muy cuidadosamente ambas soluciones. Se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min.
4. Se retiró el medio de las células sembradas en la placa de 96 pozos.
5. Se colocaron 50 μL de la mezcla en cada pozo.
6. Se incubaron las células 6 hrs a 37°C.
7. Se añadieron 200 μL de medio con suero y antibiótico.
8. Los ensayos de luciferasa se realizaron 24 y 48 horas después de la transfección.

3.4.6 ENSAYO DE LUCIFERASA

Las células transfectadas fueron lisadas a las 24 y 48 hrs. Para la detección de la señal se utilizó el sustrato de Luciferasa y la solución STOP para renilla con la cual se normalizaron los valores de luciferasa.

1. Se trataron las células con un buffer de lisis 1X.
2. Se preparó sustrato de luciferasa para cada muestra.
3. Se utilizó 50 μL del sustrato de luciferasa para 10 μL del producto de la lisis.
4. Se tomó la lectura de luciferasa en un luminómetro y posteriormente se añadieron 50 μL de solución STOP & Glo.
5. Se tomó la lectura de renilla.

3.4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estadístico descriptivo:

- a) Variables demográficas.
- b) Distribución porcentual de los genotipos.

Análisis de correlación de Spearman para datos no paramétricos:

- a) SPSS v 10.0

ANOVA de una vía

- a) SPSS v 10.0

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

I. Correlacionar el genotipo de *TS* en pacientes con cáncer gastrointestinal con la respuesta al tratamiento con 5-FU.

Se recolectaron 46 muestras de tejido de cáncer gastrointestinal derivadas de pacientes que habían recibido tratamiento con 5-FU. En el grupo de cáncer de colon la *n* fue de 19 pacientes mientras que para cáncer de estómago fue de 27. En ambos grupos la edad presentó una media de 58 años y el género masculino fue predominante.

Tabla II. Variables demográficas del grupo de cáncer de colon.

CANCER DE COLON

HOMBRES	68 0 0
MUJERES	32 0 0
EDAD	58.25 ± 16 92
n	19

Tabla III. Variables demográficas del grupo de cáncer de estómago.

CANCER DE ESTOMAGO

HOMBRES	81 0 0
MUJERES	19 0 0
EDAD	58 6 ± 14 6
n	27

4.1.1 Determinación del número de repeticiones en tandem en la región 5-UTR de *TS*.

A partir de DNA aislado del tejido embebido en parafina de cáncer de colon y estómago, se amplificaron mediante PCR fragmentos de 119 y 147 pb para detectar el número de repeticiones en tandem contenido en los VNTR's de *TS* (Figuras V y VI).

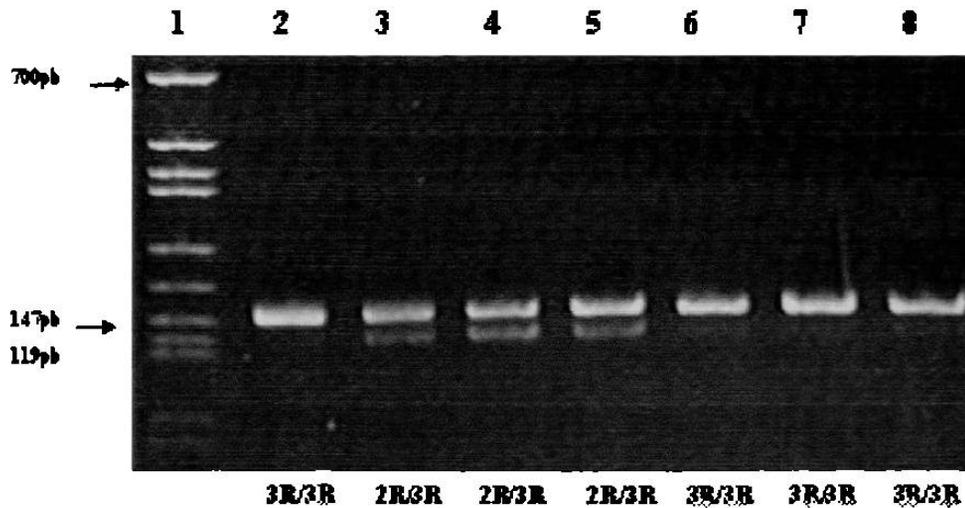


Figura V. Productos Amplificados. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador pBS+MspI. Carriles 2, 6-8: producto amplificado de 147 pb. Carriles 3-5: productos amplificados de 147 y 119 pb.

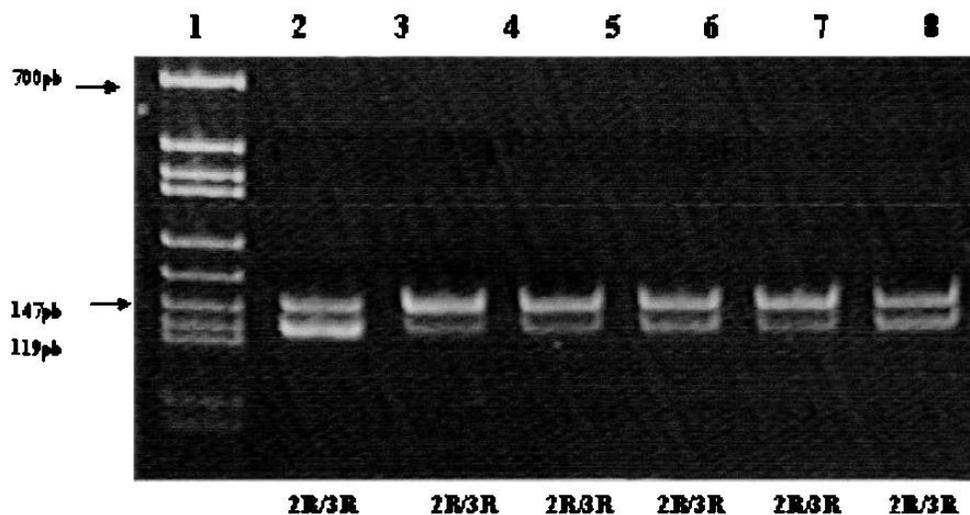


Figura VI. Productos Amplificados. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador pBS+MspI. Carriles 2-8: productos amplificados de 147 y 119 pb.

Los fragmentos de 147 pb representan homocigocidad para las tres repeticiones; un fragmento de 119 pb homocigocidad para las dos repeticiones y un par de fragmentos de 147 y 119 pb heterocigocidad.

4.1.2 Distribución porcentual del genotipo *TS* en base al número de repeticiones.

De las 46 muestras de cáncer gastrointestinal procesadas se encontró que el 55% fue heterocigoto 2R/3R y 45% homocigoto 3R/3R. No se encontró ninguna muestra con genotipo homocigoto 2R/2R (Grafica I).

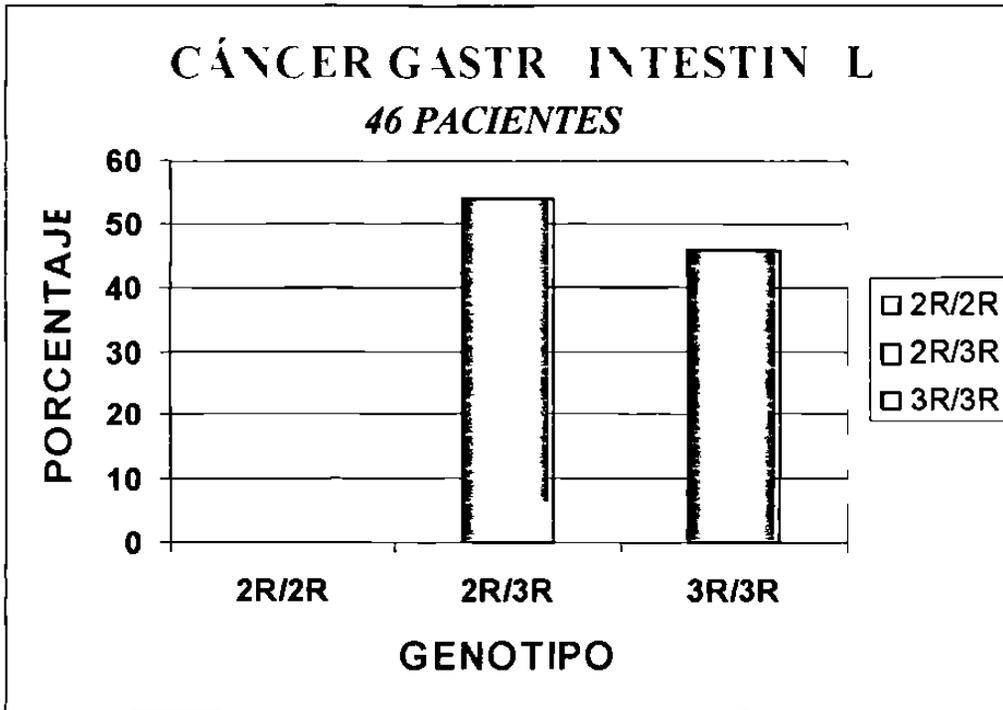


Figura VII. Resultados obtenidos de los productos amplificados de las 46 muestras de cáncer gastrointestinal.

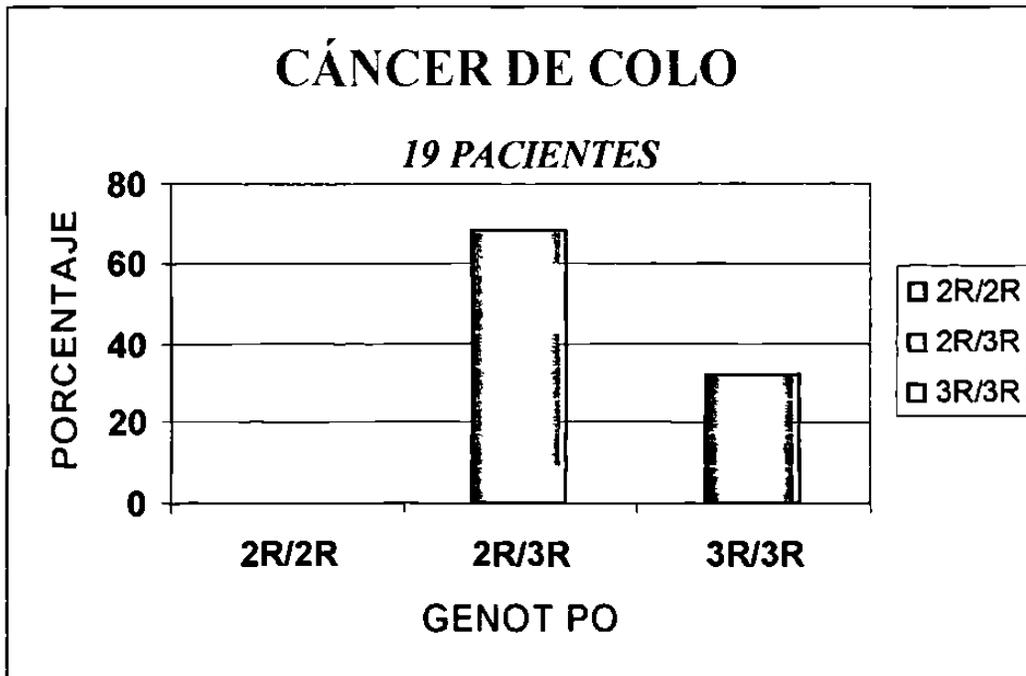


Figura VIII. Resultados obtenidos de los productos amplificados de las 19 muestras de cáncer de colon.

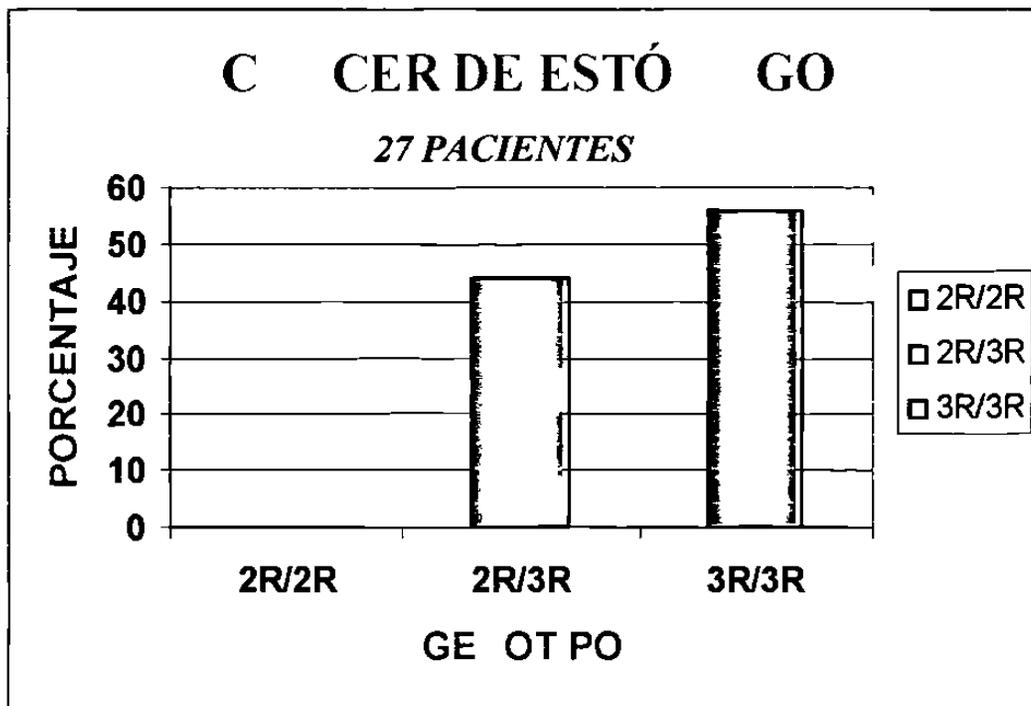


Figura IX. Resultados obtenidos de los productos amplificados de las 27 muestras de cáncer de estómago.

Al clasificar la información en cáncer de colon y estómago se encontró en el grupo con cáncer de colon (19 pacientes) que el 70% era heterocigoto 2R/3R y el 30% homocigoto 3R/3R (Gráfica VIII); en el grupo de cáncer de estómago (27 pacientes) se encontró que el 45% fue heterocigoto 2R/3R y 55% homocigoto 3R/3R (Gráfica IX). No se encontró ninguna muestra con genotipo homocigoto 2R/2R en ninguno de los grupos.

4.1.3 Frecuencia alélica de las variantes 2R y 3R en cáncer gastrointestinal.

Mediante un cálculo de binomio al cuadrado ($p^2 + 2 pq + q^2 = 1$) se definió la frecuencia de los alelos 2R y 3R en el grupo de cáncer de colon y estómago (Tabla III).

Tabla IV. Frecuencia alélica de las variantes 2R y 3R de *TS*.

CÁNCER GASTROINTESTINAL		CÁNCER DE COLON	
3R	0.73	3R	0.66
2R	0.27	2R	0.34

CÁNCER DE ESTÓMAGO	
3R	0.75
2R	0.25

En las muestras incluidas en el estudio, el alelo 3R fue predominante tanto en el grupo de cáncer de colon como en el de cáncer de estómago.

4.1.4 Digestión de los amplicones *TS* con la enzima *HaeIII*.

Los productos de PCR de 119 y 147 pb fueron digeridos con la enzima de restricción *HaeIII*, para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) contenido en los VNTR's de *TS*. La enzima de restricción *HaeIII* reconoce la forma wild-type de los VNTR's de *TS*.

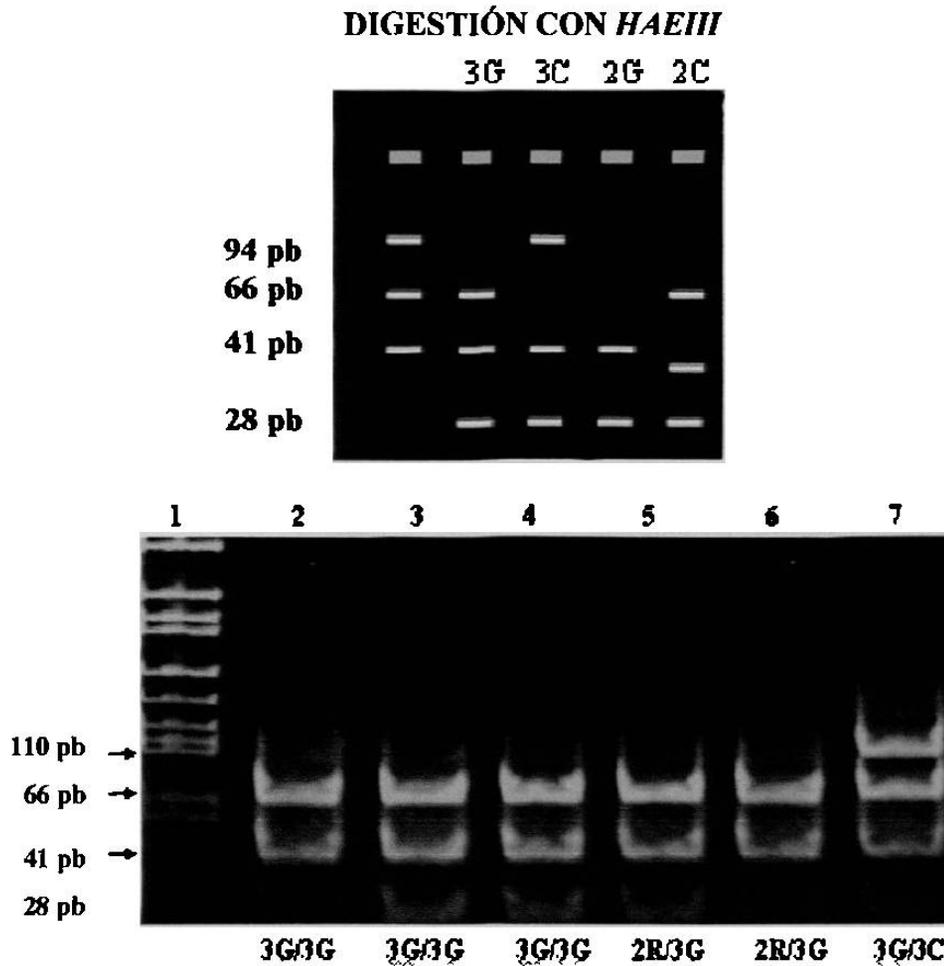


Figura X. Productos Digeridos con *HaeIII*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador pBS+MspI. Carriles 2-4: 3G/3G. Carriles 5-6: 2R/3G. Carril 7:

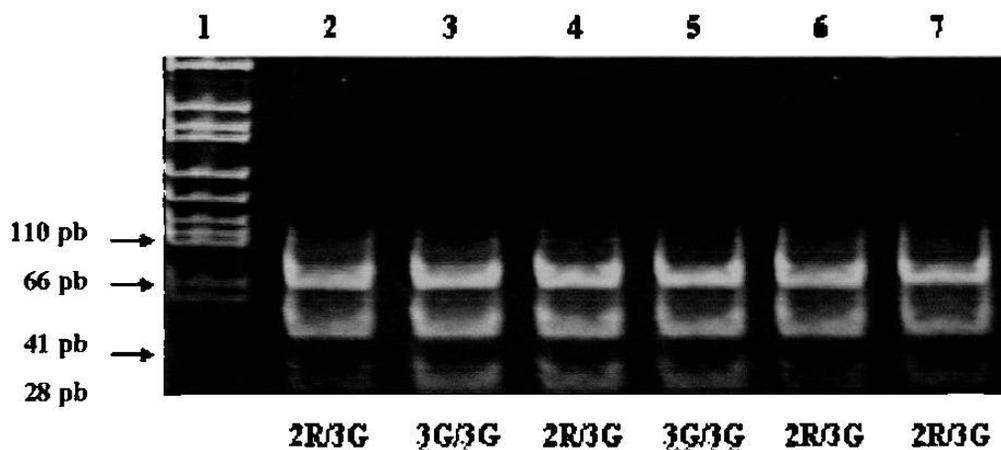


Figura XI. Productos Digeridos con *HaeIII*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador pBS+MspI. Carriles 3 y 5: 3G/3G. Carriles 2, 4, 6 y 7: 2R/3G.

4.1.5 Distribución porcentual del genotipo *TS* en base al número de repeticiones y SNP.

Las características genotípicas de los VNTR's de *TS* considerando el SNP en el grupo con cáncer de colon (19 pacientes) fueron las siguientes: el 70% era 2R/3G, el 25% homocigoto 3G/3G y 5% 3G/3C (Gráfica XII); en el grupo de cáncer de estómago (27 pacientes) se encontró que el 50% fue 2R/3G, 25% homocigoto 3G/3G y 25% homocigoto 3C/3C (Gráfica XIII).

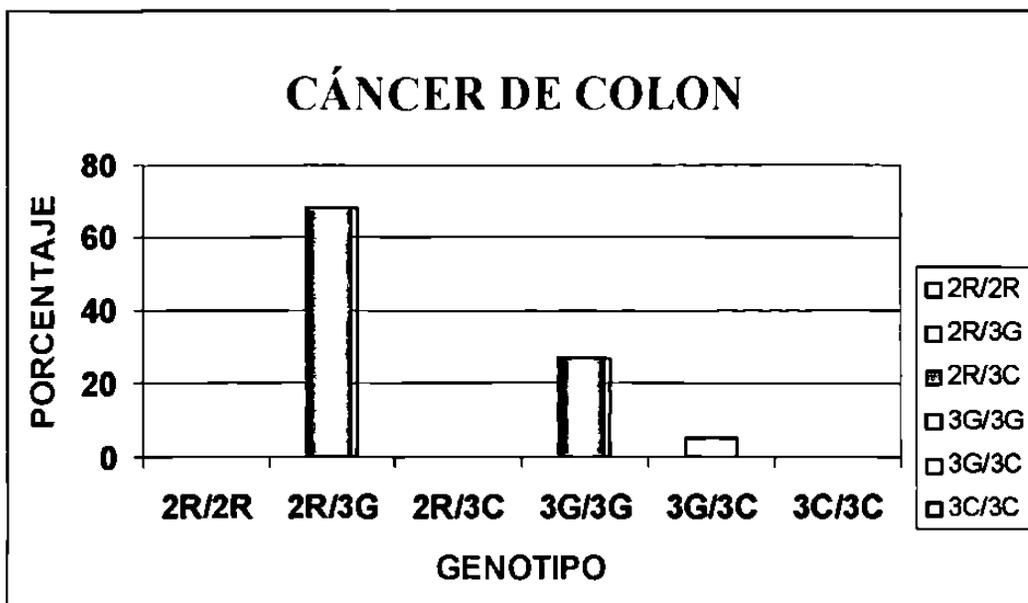


Figura XII. Resultados obtenidos de los productos de la digestión con la enzima *HaeIII* de las 19 muestras de cáncer de colon.

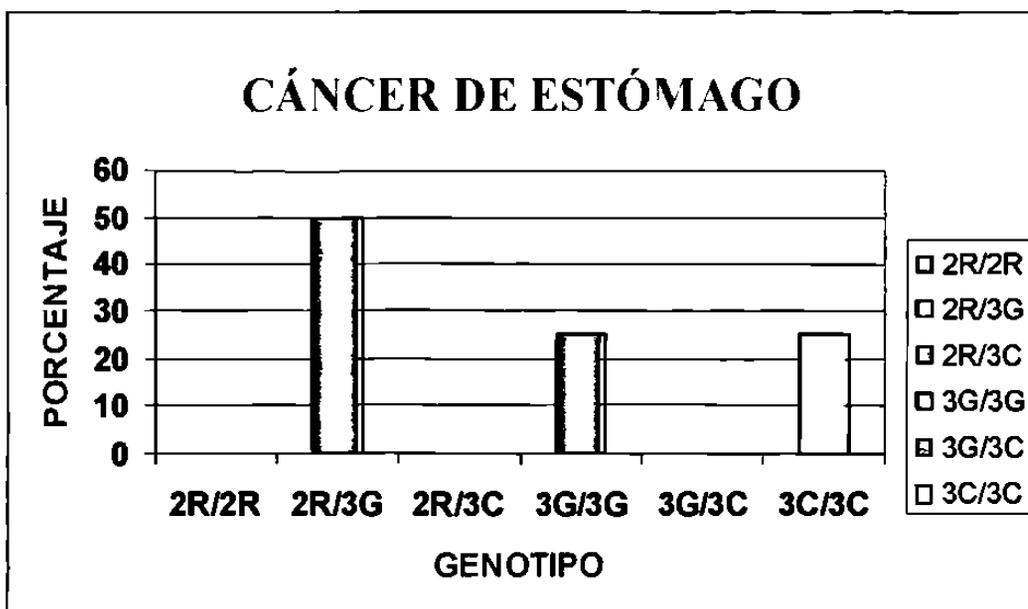


Figura XIII. Resultados obtenidos de los productos de la digestión con la enzima *HaeIII* de las 27 muestras de cáncer de estómago.

4.1.6 Clasificación de genotipos en base a la respuesta a 5-Fluorouracilo.

La información de los expedientes fue clasificada en base a la respuesta al tratamiento con 5-FU (Tabla IV). El grupo con respuesta completa incluyó pacientes que se referían asintomáticos en su última consulta. En el grupo con respuesta parcial los pacientes presentaron una leve mejoría; sin embargo, seguían manifestando síntomas clínicos.

Tabla V. Clasificación de genotipos en base a la respuesta al tratamiento con 5-FU.

RESPUESTA COMPLETA

2R/3R	70%
3R/3R	30%

RESPUESTA PARCIAL

2R/3R	0%
3R/3R	100%

En el grupo con respuesta completa el genotipo predominante con un 70% fue heterocigoto: 2R/3R, mientras que en el grupo con respuesta parcial el genotipo estuvo representado por la forma 3R/3R en un 100%.

II. Asociar la presencia de la proteína *TS* con el genotipo y el estadio de la enfermedad.

4.2 Inmunohistoquímica

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal primario con un sitio de unión específico contra *TS*. La señal fue detectada con un anticuerpo secundario biotilado, un complejo de fosfatasa alcalina y el sustrato diaminobencidina.

INMUNOHISTOQUÍMICA

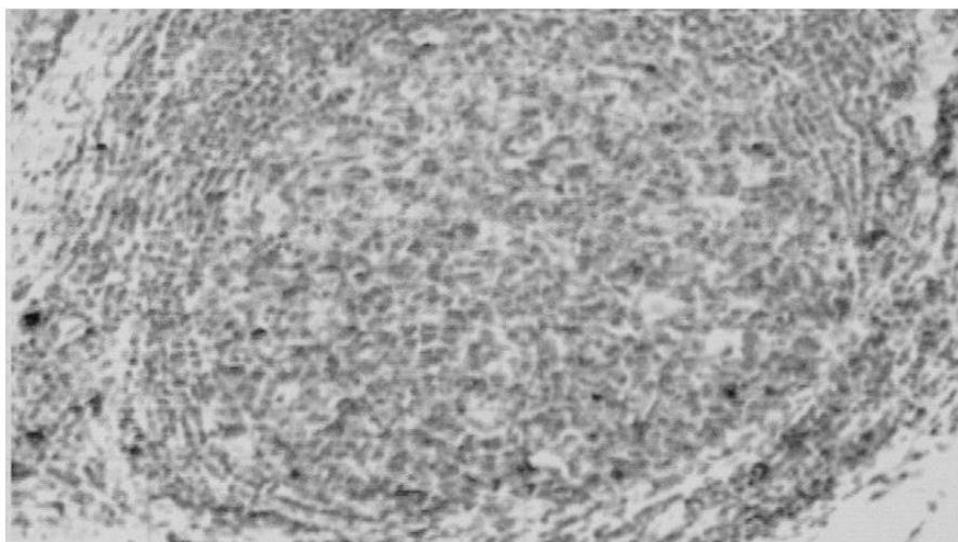
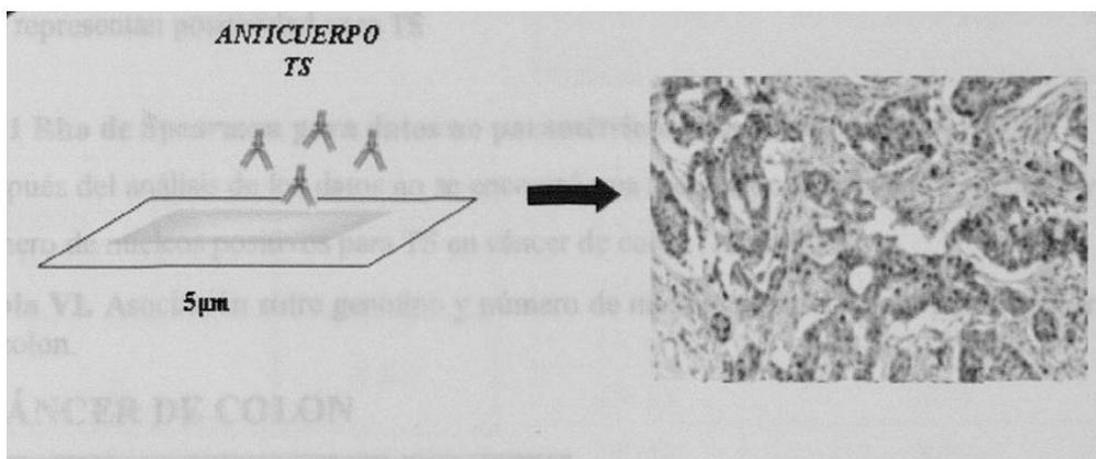
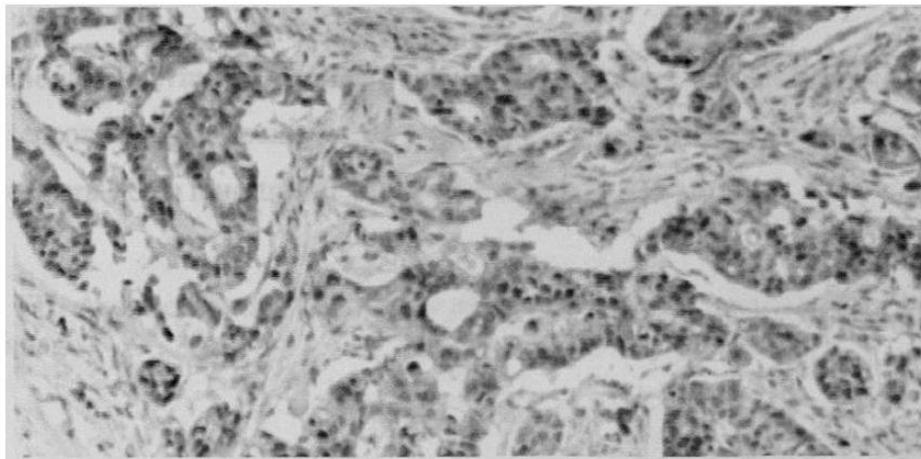


Figura XIV. Control positivo. Folículo linfóide con núcleos positivos para la proteína Timidilato Sintasa.



40X

Figura V. Corte histológico de una biopsia de cáncer de colon: los núcleos teñidos de color café representan positividad para TS.

4.2.1 Rho de Spearman para datos no paramétricos- *cáncer de colon.*

Después del análisis de los datos no se encontró una asociación directa entre genotipo y número de núcleos positivos para TS en cáncer de colon (Tabla V).

Tabla VI. Asociación entre genotipo y número de núcleos positivos para TS en cáncer de colon.

CÁNCER DE COLON

GENOTIPO	NUCLEOS TEÑIDOS
3G 3C	80%
2R 3G	60%
2R/3G	70%
3G 3G	5%
3G/3G	40%
2R/3G	10%
3G 3G	20%
2R/3G	80%
3G 3G	0%
2R/3G	40%
2R 3G	0%
2R/3G	0%
2R/3G	80%
2R/3G	30%
2R 3G	5%

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	0.032
p	0.906

4.2.2 Rho de Spearman para datos no paramétricos-cáncer de estómago.

No se encontró una asociación directa entre el genotipo y el número de núcleos positivos para TS en muestras de cáncer de estómago (Tabla VI).

Tabla VII. Asociación entre genotipo y número de núcleos positivos para TS en cáncer de estómago.

		CÁNCER DE ESTÓMAGO	
		<i>GENOTIPO</i>	<i>NUCLEOS TEÑIDOS</i>
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	0.232	<i>2R 3R</i>	<i>30°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>40°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>35°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>30°</i>
p	0.467	<i>2R 3R</i>	<i>10°</i>
		<i>2R 3R</i>	<i>50°</i>
		<i>2R 3R</i>	<i>30°</i>
		<i>2R 3R</i>	<i>10°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>30°</i>
		<i>2R 3R</i>	<i>30°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>20°</i>
		<i>3R 3R</i>	<i>30°</i>

4.2.2 Clasificación de los resultados de la Inmunohistoquímica en base al estadio de la enfermedad.

Se determinó la mediana del número de núcleos positivos para TS en las muestras procesadas por inmunohistoquímica, para después agrupar los resultados por estadios. En el grupo con estadio II se encontró el porcentaje más alto de la mediana, la cual fue de 70% (Tabla VII).

Tabla VIII. Después del análisis de los datos no se encontró una asociación directa entre estadio y número de núcleos positivos para TS en cáncer de colon.

MEDIANA

ESTADÍO II	ESTADÍO III A	ESTADÍO III B	ESTADÍO IV
70%	42.5%	5%	40%
75% 2R/3R 25% 3R/3R	100% 2R/3R	100% 3R/3R	100% 3R/3R

***RHO DE SPEARMAN NO
PARAMETRICA***

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	-0 361
P	0 249

III. Analizar el efecto de las repeticiones en tandem de *TS* sobre la expresión de un gen reportero en la línea celular HT-29 y AGS

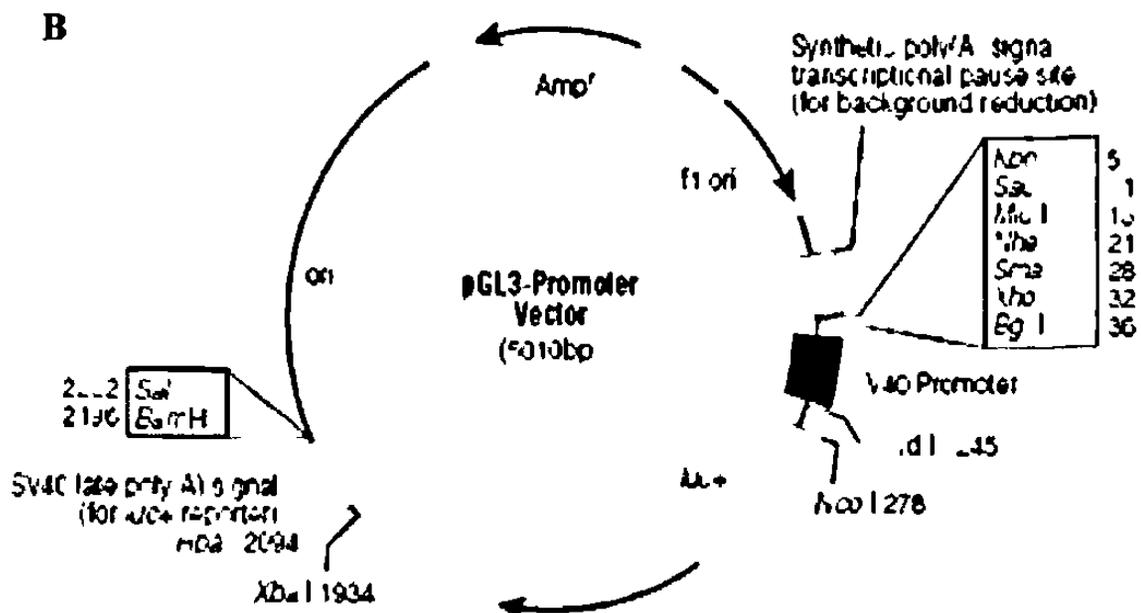
4.3 Clonación de las variantes 2C y 3G en el vector de expresión SV40-PGL3.

Se amplificaron las variantes 2C y 3G de *TS* utilizando un juego de oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *NcoI*; estos sitios también están contenidos en el vector SV40-PGL3 (Figura X). Tanto los insertos como el plásmido fueron digeridos con *HindIII-NcoI*; los productos fueron ligados.

Los plásmidos se caracterizaron mediante PCR y digestión enzimática (Figura XI).

A F: 5-gTTCATAAgCTTgAAAAGGCgCgCggAAggggTCC-3 *HINDIII* (AAGCTT)

R: 5- CTAgAACCATGGTCCgAgCCggCCACaggCAT-3 *NCOI* (CCATgg)



GTTCATAAGCTTGAAAAGGCgCgCggAAggggTCC-3
CCTGCCA
CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG
CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG
CCGCGCCACTTCGCCTGCCTCCGTCCCC
GCCCGCCGCGCCATGCCTGTGGCCGGCTCGGAC
CATGGTCCGAGCCGGCCACAGGCAT

Figura XVI. A. Oligonucleótido sentido y anti-sentido con sitios *HindIII* y *NcoI* respectivamente. B. Vector SV40-PGL3 e inserto 3G con sitios de restricción *HindIII-NcoI*.

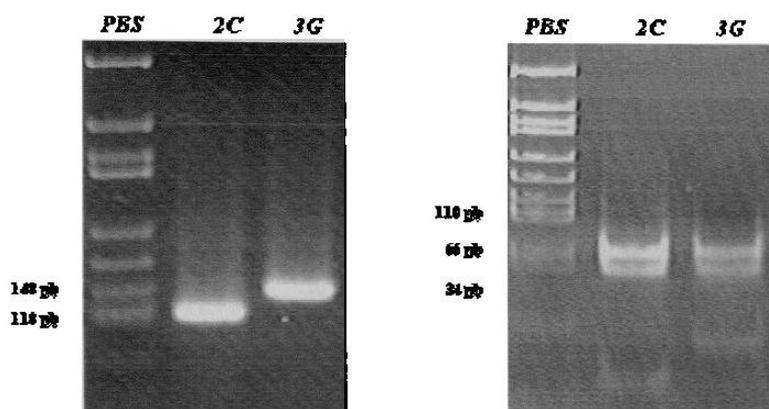


Figura XVII. Caracterización de las variantes 2C y 3G clonadas en SV40-PGL3, mediante PCR y digestión con la enzima *HaeIII*.

4.3.1 Ensayos de transfección en las líneas celulares de HT-29 y AGS.

TRANSFECCIÓN

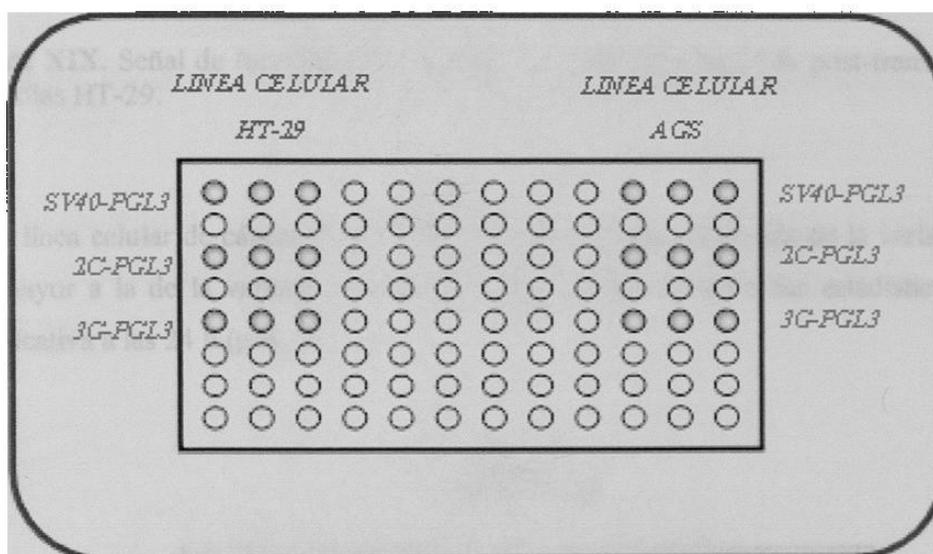


Figura XVIII. Los ensayos de transfección se realizaron en placas de 96 pozos. Se cultivaron 25,000 células HT-29 y 15, 000 células AGS por pozo.

Las células alcanzaron un 80% de confluencia 12 horas después de ser cultivadas y éstas fueron transfectadas con el plásmido control (PGL3 sin inserto) o bien con el plásmido problema (PGL-2C ó 3G) junto con el vector CMV-Renilla para normalizar los resultados. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La detección de luciferasa fue hecha a las 24 y 48 hrs. post-transfección.

CÁNCER DE COLON

24 HORAS

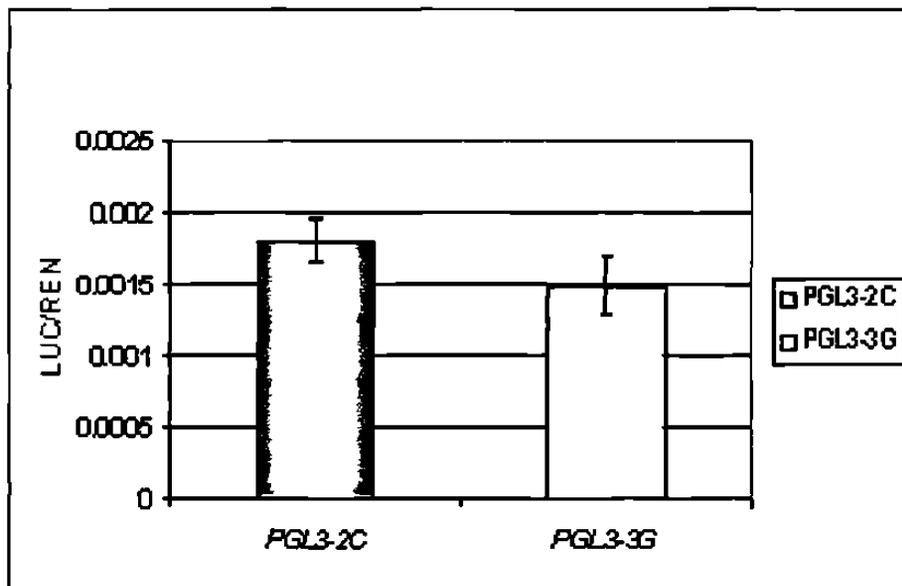


Figura XIX. Señal de luciferasa normalizada con Renilla a las 24 h. post-transfección en células HT-29.

En la línea celular de cáncer de colon la señal de luciferasa derivada de la variante 2C fue mayor a la de la variante 3G; sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa a las 24 h ($p > 0.05$).

ANOVA

F	3.25
p	0.145

Tabla IX. ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular HT-29.

CÁNCER DE COLON

48 HORAS

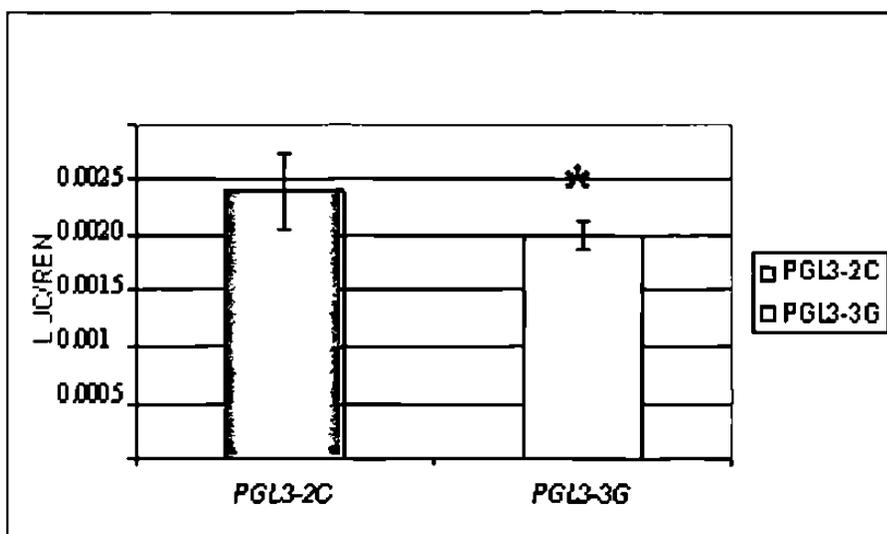


Figura XX. Señal de luciferasa normalizada con Renilla a las 48 h post-transfección en células HT-29.

En la línea celular de cáncer de colon la señal de luciferasa derivada de la variante 2C fue mayor a la de la variante 3G; la diferencia fue estadísticamente significativa a las 48 h ($p < 0.05$).

ANOVA

F	15.65
p	0.017

Tabla X. ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 48 h post-transfección en la línea celular HT-29.

CÁNCER DE ESTÓMAGO

24 HORAS

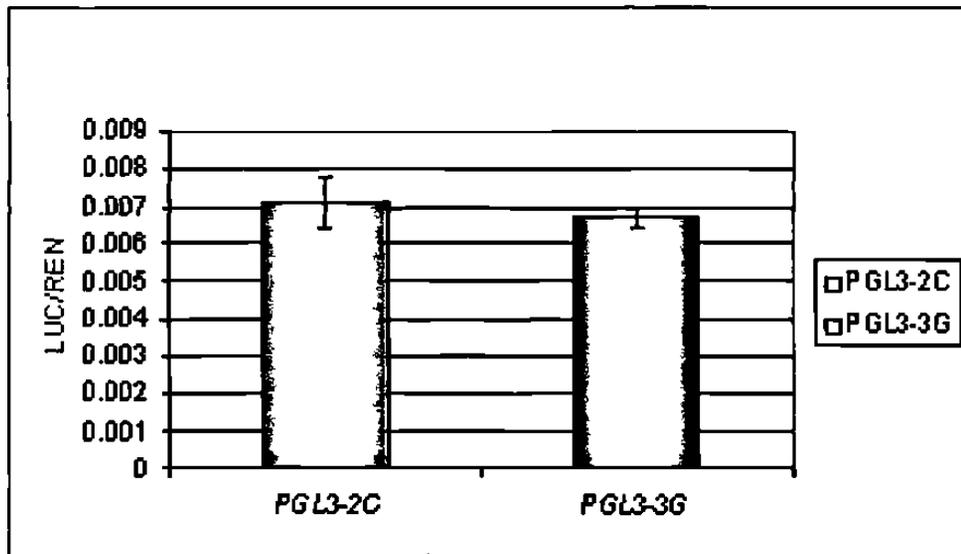


Figura XXI. Señal de luciferasa normalizada con Renilla a las 24 h post-transfección en células AGS.

En la línea celular de cáncer de estómago la señal de luciferasa derivada de la variante 2C fue mayor a la de la variante 3G; sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa a las 24 h ($p > 0.05$).

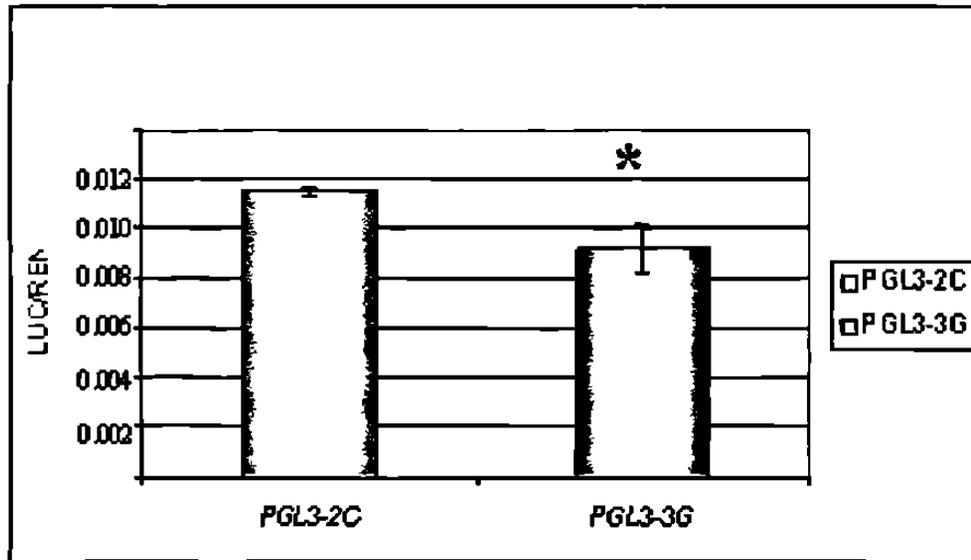
ANOVA

F	3.61
p	0.153

Tabla XI. ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 24 h post-transfección en la línea celular AGS.

CÁNCER DE ESTÓMAGO

48 HORAS



FiguraXXII. Señal de luciferasa normalizada con Renilla a las 48 h. post-transfección en células AGS.

En la línea celular de cáncer de colon la señal de luciferasa derivada de la variante 2C fue mayor a la de la variante 3G; la diferencia fue estadísticamente significativa a las 48 h ($p < 0.05$).

ANOVA

F	15.79
p	0.016

Tabla XII. ANOVA: Ensayo de Luciferasa a las 48h post-transfección en la línea celular AGS.

CAPITULO V

5.1 DISCUSIÓN

Es de gran interés la identificación de blancos quimioterapéuticos para la selección del mejor tratamiento contra neoplasias malignas, que le permitan al médico ayudar a al paciente a mejorar su calidad de vida e incrementar su sobrevida.

En un análisis farmacogenético se busca la asociación entre las características estructurales de un gen y la respuesta a un tratamiento. En el presente estudio se genotificaron los VNTR's de *Timidilato Sintasa (TS)*, lo cuales representan un número variable de repeticiones en tandem contenidas en la región 5'-UTR del gen.

Nuestro grupo de estudio estuvo conformado por muestras de tejido embebido en parafina derivado de pacientes con cáncer de estómago ó colon y que habían recibido tratamiento adyuvante con 5-Fluorouracilo (5-FU). Se recuperaron 46 muestras de cáncer gastrointestinal que correspondían al periodo del 2000-2005; 19 muestras pertenecían a cáncer de colon y 27 a cáncer de estómago.

La distribución porcentual del genotipo en base al número de repeticiones en el grupo de cáncer gastrointestinal fue de 55% para heterocigotos TS2/TS3 y 45% para homocigotos TS3/TS3; para cáncer de colon: 70% TS2/TS3 y 30% TS3/TS3; para cáncer de estómago: 45% TS2/TS3 y 55% TS3/TS3. En las muestras analizadas no se encontraron homocigotos TS2/TS2.

Después de la revisión de los expedientes, la información fue clasificada en base a la respuesta al tratamiento con 5-FU; una respuesta completa está representada por pacientes asintomáticos después del tratamiento; una respuesta parcial contempla pacientes con una leve mejoría pero con manifestaciones de malestar clínico. En el grupo con respuesta completa el 70% era heterocigoto TS2/TS3 y el 30% TS3/TS3, mientras que en el grupo con respuesta parcial el 100% fue TS3/TS3. En base a lo anterior, la predicción de la respuesta al tratamiento con 5-FU en nuestro grupo de estudio puede ser considerada válida en un 70% respecto al grupo con respuesta completa, ya que los pacientes contaban con al menos un alelo TS2, el cual está asociado a una menor resistencia al tratamiento; sin embargo, debe señalarse que la

muestra es muy pequeña, por lo que es necesario incrementar la n para obtener resultados mas definitivos.

Timidilato Sintasa es la principal enzima blanco para 5- Fluorouracilo; sin embargo, *DPD* y *TP* junto con *TS* predicen en un 100% la respuesta a 5-FU, por anterior, lo ideal es genotipificar las mutaciones asociadas a la respuesta a 5-FU en estos 3 genes, para definir un perfil de respuesta más específico y con ello plantear un mejor esquema de tratamiento para el paciente.

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para la detección de la proteína *TS* en las muestras de cáncer gastrointestinal. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal primario contra *TS*. La interpretación de los resultados fue hecha por un médico patólogo, el cual reportó el número de núcleos positivos (%) para *TS*.

La información fue analizada mediante la prueba estadística Rho de Spearman para datos no paramétricos (SPSS 10.0) y se encontró que no existe una asociación directa entre el genotipo y el porcentaje de núcleos teñidos mediante inmunohistoquímica en las muestras analizadas. Ya que la inmunohistoquímica solo indica presencia o ausencia de la proteína el siguiente paso recomendable es definir si la cantidad de proteína de *TS* se relaciona con su genotipo y para ello lo ideal será realizar ensayos más precisos como western-blot, ELISA o ensayos enzimáticos, partiendo de tejido fresco.

Las líneas celulares HT-29 y AGS (cáncer de colon y estómago) fueron transfectadas con el plásmido SV40-PGL3 el cual contenía río abajo del promotor la variante 2C ó 3G de *TS* y el gen reportero de luciferasa.

El resultado del análisis funcional en las líneas celulares HT-29 y AGS es diferente a lo reportado por Kawakami y cols, (2003) en células HeLa, ya que ellos observaron una mayor señal de luciferasa derivada de la forma 3G que en las variantes 2C, 2G ó 3C. En nuestro ensayo la señal de luciferasa fue mayor en las células transfectadas con el plásmido que contenían la variante 2C con respecto a 3G. El efecto de las variantes 3G

y 2C en las líneas celulares de cáncer de estómago y colon generó una diferencia estadísticamente significativa a las 48 h.

Por el momento desconocemos porque existe una diferencia en el comportamiento de los VNTR's de *TS* sobre la expresión el gen reportero de *luciferasa* en las líneas celulares de cáncer gastrointestinal (HT-29 y AGS) y las células HeLa, pero esta diferencia podría atribuirse a la maquinaria celular, ya que existen diversos complejos proteicos que actúan sobre secuencias consenso contenidas en los VNTR's de *TS*, como las proteínas USF-1, Sp1 y E2F cuyo papel es primordial en la expresión del gen *TS* a nivel transcripcional.

En el año 2003, Mandola y cols. determinaron que las proteínas USF-1 se unen a la región 5'-UTR de *TS* e incrementan la transcripción del gen. Por otra parte la proteína Sp-1, se une a motivos GC contenidos en los VNTR's de *TS*, actuando como activador transcripcional. Finalmente cabe señalar que este conjunto de proteínas también pueden ser considerados blancos terapéuticos ya que modulan directamente la expresión de *Timidilato Sintasa*.

CAPITULO VI

6.1 CONCLUSIONES

I. El genotipo 3R/3R es predominante en sujetos con respuesta parcial al tratamiento con 5-FU.

II. El genotipo 2R/2R no se encontró en nuestro grupo de estudio.

III. En el grupo de sujetos con respuesta completa el 70% tenía al menos un alelo 2R.

IV. La variante 2C de *TS* indujo una mayor señal de luciferasa en las líneas celulares HT-29 y AGS con respecto a 3G.

BIBLIOGRAFIA

- Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, et al.: Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer* 89 (7): 1418-24, 2000.
- Amatori F, Danesi R. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogenetics and genomics*. 16(11):809-16, 2006.
- Andrea V. Gamarnik and Raul Andino. Interactions of Viral Protein 3CD and Poly(rC) Binding Protein with the 5' Untranslated Region of the Poliovirus Genome. *Journal of Virology*, p. 2219-2226, Vol. 74, No. 5, March 2000.
- Chang HM, Jung KH, Kim TY, et al.: A phase III randomized trial of 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in curatively resected gastric cancer. *Ann Oncol* 13 (11): 1779-85, 2002.
- Ciaparrone M, Borone C. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-Fluorouracil. *Oncology*;70(5):366-77, 2006.
- Di paollo Antonello, Danesi Romano, Del Tacca Mario. Pharmacogenetics of neoplastic diseases: new trenes.research 49, 331-342, 2004.
- Fujiwara Hisataka, Tareshima Masanori, Fukushima Masakazu. Quantitative measurement of .Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA level in gastric cancer by real-time RT-PCR. *Jpn J. Cancer Res*. 93, 1342-1350, december 2002
- Gmeiner WH. Novel chemical strategies for thymidylate synthase inhibition. *Current medicinal chemistry*. 12(2):191-202, 2005.

- Gunderson LL, Sosin H: Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a re-operation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 (1): 1-11, 1982.
- Hisataka Fujiwara and Fukushima. Quantitative Measurement of Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Level in Gastric Cancer by Real-time RT-PCR *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1342–1350, December 2002.
- INEGI. Estadísticas Vitales 2002. Base de datos y estadísticas demográficas 2003. www.inegi.gob.mx
- Irvin D. Fleming. *Manual for Staging of Cancer. Fifth Edition.* Published by Lippincott-Raven Publishers. Chapter 12, 1998.
- Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gen polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncology*; 23: 1365-13-69, 2005.
- Kawakami K, Denenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *7(12):4096-101*, Dic 2001.
- Kawakami, Watanabe. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* Sep 15;63(18):6004-7, 2003.
- Kazuyuki Kawakami, Dennis Salonga and Meter V Danenberg. Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Expression. *Clin Cancer Res* Dec;7(12):4096-101, 2001.

- Ko KH, Hgang SG. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) as a risk factor of cholangiocarcinoma in a Korean population. *Anticancer Research*. 26(6B):4229-33, 2006.
- Lecomte Thierry, Ferraz Jean-Marc, Laurent-Puig Pierre. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clinical cancer research*. Vol. 10, 5880-5888, september 1, 2004.
- Lee W, Lockhart C, Kim R, Rothenberg M. Cancer Pharmacogenetics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The oncologist*. 10; 104-111, 2005.
- Lenz, H-J. Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Annals of oncology* 15: iv173-iv177, 2004.
- Longley Daniel, Harbin Paul, Johnston Patrick. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature publishing group*. Vol 3, 330-338, 2003 .
- Makeyev Aleksandr, Liebhaber Stephen. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, 8:265-278. Cambridge university Press, 2002.
- Mandola M, lenz HJ and Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5'tandem repeat polymorphism of the Thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Research* 63, 2698-2904, June 1, 2003.
- Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy?. *Cancer Chemother Pharmacol*. Sep 27;1-6, 2005.

- PinedoHM, Peter GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *Journal of clinical oncology* 6(10):1653-64,1988.
- Pullarkat ST, Stoehlmacher, V Ghaderi, Y-P Xiong, SA Ingles, A Sherrod, R Warren, D Tsao-Wei, S Groshen, H-J Lenz. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal* 1, 65-70, 2001.
- Pullman R and Gorospe Myriam. Differential stability of Thymidylate Synthase 3'-Untranslated region polymorphic variants regulated by AUF-1. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 281. No 33, pp. 23456-23463, August 18, 2006.
- Salonga D, Danenberg KD, Jonson M, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to -fluorouracil have low gene expresión levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clinical Cancer Research*, Apr; 6(4): 1322-7, 2000.
- T. Kubota, K. Yoshinare, M. Watanabe, H. Hasegawa, H. Nishibori, M. Kitajima. Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. *Cancer Sci*. Jul;94(7):633-8, 2003.
- Temitope Keku, Robert Millikan, Kendra Worley, Scott Winkel, Allison Eaton, Lorna Biscocho, Christopher Martin and Robert Sandler 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Codon 677 and 1298 Polymorphisms and Colon Cancer in African Americans and Whites *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Dec;11(12):1611-21, 2002 .
- Teqze B, Gyorffy B. Chemotherapy agents, response rates and mechanisms of resistance in the therapy of the colorectal carcinoma. *Magyar onkologia*. 50(4):315-23, 2006.

- van Kuilenberg , Meinsma R and van Gennip. Pyrimidine Degradation Defects and Severe 5-Fluorouracil Toxicity. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. Vol 23, Nos 8 y 9, pp. 1371-1375, 2004.
- van Kuilenburg André, Meinsma Rutger, Dobritsch Doren. Identification of three novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with altered pre-mRNA splicing or protein function. *Biol. Chem.*, Vol. 386, pp. 319-324, April 2005.
- van Kuilenburg, Erik W. Muller, Janet Haasjes, Rutger Meinsma, Lida Zoetekouw, Hans R. Waterham, Frank Baas, Dick J. Richel and Albert H. van Gennip Lethal Outcome of a Patient with a Complete Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency after Administration of 5-Fluorouracil *Clin Cancer Res*. May;7(5):1149-53, 2001 .
- Voeller Donna M, Zajac-Kaye Maria, Fisher Robert J, Allegra Carmen J. The identification of thymidylate synthase peptide domains located in the interface region that bind thymidylate synthase mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 24-31, 2002.
- Yawata Ayazo, Osawa Shogo, Sawada Jun-ichi. Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlatos with cxellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 Nov;56(5):465-72. Epub May 26, 2005.
- Zhihua Du, Jinghua Yu, Yihong Chen, Raul Andino, and Thomas L. James. Specific Recognition of the C-rich Strand of Human Telomeric DNA and the RNA Template of Human Telomerase by the First KH Domain of Human Poly(C)-binding Protein-2. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 46, 48126-48134, November 12, 2004.



DON TIVO

