

Nº 109  
JES



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EXPRESION DE ALFAFETOPROTEINA Y LOS ONCOGENES  
c - fos, c - myc y c - Ki - ras EN CARCINOMA  
COLORECTAL HUMANO**

**TESIS EXPERIMENTAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
IRMA REYNA MORILLON ROMERO



MEXICO, D. F.

1992

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ABREVIATURAS

CC	Carcinoma Colorectal
ODC	Ornitina Decarboxilasa
COI	Citocromo Oxidasa I
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral $\beta$
PDGF	Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
GTP	Trifosfato de Guanidina
GDP	Difosfato de Guanidina
GTPasa	Guanosin Trifosfatasa
GAP	Proteina Activadora de GTPasa
AMPc	Monofosfato de Adenosin cíclico
ADN	Acido desoxirribonucléico
ARN	Acido ribonucléico
ARNm	Acido ribonucléico mensajero
$\mu$	micras
$\mu$ g	microgramos
g	gramos
ml	mililitros
mg	miligramos
c.b.p	cuanto baste para
U	Unidad
$\mu$ l	microlitro
ng	nanogramos
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
T.A.	temperatura ambiente
mBq	Milibequeles
mCi	Milicuries
mmol	Milimol
AFP	$\alpha$ -fetoproteína
DEPC	Dietilpirocarbonato
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
TPA	Forbol de Ester

## INDICE

	PAGINA.
I INTRODUCCION .....	1
1.1 Planteamiento del problema	
1.2 Objetivos	
1.3 Hipótesis	
1.4 Justificación	
II ANTECEDENTES .....	4
2.1 Historia .....	4
2.1.1 Concepto de cáncer	
2.1.2 Terminología	
2.1.3 La evolución del cáncer	
2.1.4 Ciencias involucradas	
2.1.5 El cáncer colorectal	
2.2 Epidemiología .....	6
2.2.1 En cáncer colorectal	
2.2.2 Estudios epidemiológicos	
2.3 Factores de riesgo.....	9
2.3.1 Reseña	
2.3.2 Dieta	
2.3.3 Factores ambientales	
2.3.4 Enfermedades benignas	
2.3.5 Factores generales	
2.4 Etiología.....	16
2.4.1 Por diversos aspectos	
2.4.2 Mecanismos	

2.5 Sintomatología.....	19
2.5.1 Transtornos funcionales	
2.5.2 Expresión de moléculas antigénicas frecuentes	
2.6 Anatomía patológica.....	20
2.6.1 Macroscopía	
2.6.2 Microscopía	
2.6.3 Histología	
2.6.4 Metabolismo	
2.7 Clasificación del CC.....	24
2.7.1 Clásica	
2.7.2 Por su tipo histológico	
2.7.3 Por su origen tisular	
2.7.4 Por diferenciación tisular	
2.7.5 De acuerdo a Duke's	
2.8 Proceso carcinogénico.....	27
2.8.1 Iniciación	
2.8.2 Progresión	
2.8.3 Mecanismos celulares contra el proceso	
2.8.4 Expresión de moléculas antigénicas	
2.9 Metástasis.....	31
2.9.1 Mecanismo	
2.9.2 En cáncer colorectal	
2.9.3 Procesos celulares involucrados	
2.10 Marcadores tumorales.....	34
2.10.1 Concepto	
2.10.2 En cáncer colorectal	
2.10.3 Alfa-fetoproteína	
2.11 Oncogenes .....	37
2.11.1 Reseña	

2.11.2	Los oncogenes en la carcinogénesis	
2.11.3	Factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y oncogenes	
2.11.4	Oncogenes que afectan transducción de señales y mensajeros intracelulares	
2.11.5	Productos de oncogenes en citoplasma	
2.11.6	Oncogenes nucleares	
2.11.7	Cáncer hereditario y genes supresores de tumores	
2.12.	La clínica en CC	51
2.12.1.	Pronóstico	
2.12.2	Diagnóstico	
2.12.3	tratamiento	
2.12.4	Oncogenes en la clínica	

### III SECCION EXPERIMENTAL .....54

1.	Material	
1.1	Reactivos	
1.2	Material y equipo de laboratorio	
1.3	Material biológico	
2.	Métodos	63
2.1	Transformación	
2.2	Amplificación de los plásmidos	
2.3	Purificación de los plásmidos	
2.4	Digestión enzimática	
2.5	Purificación del ADNc de los oncogenes	
2.6	Extracción del ARN	
2.7	Transferencia del ARN a nitrocelulosa	
2.8	Marcado del ADNc con dCTP-P32	
2.9	Hibridación del ARN con ADNc marcado	

IV RESULTADOS Y DISCUSIONES .....73

4.1 Purificación de ADNc de los oncogenes

4.2 Purificación del ARN de las biopsias tisulares

4.3 Hibridación de los ARN y ADNc de cada oncogen

4.4 Tablas de correlación entre la expresión de los oncogenes y grados de diferenciación, malignidad y metástasis

4.5 Tabla de relación entre las expresión de los oncogenes y los tumores benignos

V CONCLUSIONES ..... 93

VI BIBLIOGRAFIA ..... 95

## I INTRODUCCION.

Evidencias experimentales han demostrado que los oncogenes activados están involucrados en eventos celulares que conducen a la transformación maligna, cuyos cambios parecen ser a nivel de mutaciones genéticas que se traducen como alteraciones transcripcionales y/o traducionales.

Este trabajo se llevó a cabo con la finalidad de estudiar la expresión del gene de AFP y los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras en CC con diferentes grados de diferenciación, invasividad y metástasis. El ARN fue extraído de 7 muestras de CC, 2 muestras de tumores benignos, y los correspondientes tejidos normales.

El análisis de "Northern blot" muestra que en tumores de CC moderadamente diferenciados, con estadios avanzados de malignidad y metástasis lejanas, la expresión de c-fos y c-myc se encuentra muy incrementada. En tumores bien diferenciados, en estadios tempranos y avanzados se observa expresión ligeramente incrementada de AFP, en los tumores benignos existe una expresión alterada de los cuatro genes analizados.

### 1.1 Planteamiento del problema

La expresión de los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras, tiene una relación con el grado de diferenciación, malignidad y metástasis en carcinoma colorectal humano?

La expresión de estos oncogenes pueden ser utilizados como marcadores de transformación maligna en tumores benignos de colon y recto?

La expresión de  $\alpha$ -fetoproteína se puede usar como marcador del tipo histológico del tumor en cáncer colorectal?

## 1.2 Hipótesis

La caracterización de la expresión del gene de AFP y los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras en un tejido neoplásico provenientes de diferentes individuos y su comparación con el tejido normal adyacente, permitirán obtener patrones de expresión específicos para cada tumor así como su correlación con el grado de diferenciación, malignidad y metástasis; la expresión alterada de estos genes podrán servir como marcadores de transformación maligna en tumores benignos.

## 1.3 Objetivos

1.3.1 Montar la metodología de extracción de ARN y Northern blot a biopsias tisulares humanas cancerosas.

1.3.2 Correlacionar la expresión de AFP y los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras con el grado de diferenciación, malignidad y metástasis.

1.3.3 Demostrar si los diferentes patrones de expresión de estos genes en tumores benignos son marcadores de una posible neoplásia.

## 1.4 Justificación

En países desarrollados se realizan investigaciones profundas en estas áreas de expresión de oncogenes, sin embargo la mayoría de dichas investigaciones son en líneas celulares y animales de laboratorio y los resultados, aunque confiables, no reflejan verdaderamente lo que acontece en el organismo humano.

El CC es un sistema excelente para la investigación de alteraciones genéticas debido a que presenta sus diferentes estadios de progresión histológicamente bien definidos. Además poco se sabe de los eventos de la progresión del CC especialmente lo relacionado con genes que llevan a la pérdida del crecimiento y la diferenciación celular. Son escasos estos estudios en la literatura y no se observan correlaciones sistemáticas con los diferentes tipos histológicos de los tumores colorectales.

Por lo cual se considera necesario analizar estudios sistemáticos de la expresión de los oncogenes tanto en tejidos tumorales como tejidos controles y correlacionar los datos moleculares con las características histológicas, así como con la progresión de la enfermedad.

## II ANTECEDENTES

### 2.1 HISTORIA.

#### 2.1.1 Concepto de Cáncer.

El cáncer es el resultado de la proliferación de una familia o de una clona de células anormales. Son alteraciones en las cuales un conjunto de células en el seno de un organismo multicelular escapan a los mecanismos regulatorios que aseguran un equilibrio entre los tejidos, produciendo un crecimiento celular desordenado y por lo tanto la producción de una masa tumoral.

El cáncer se produce tanto en humanos como en animales. Las células cancerosas pueden surgir de cualquier tejido, en cualquier edad, pudiendo invadir en forma característica tejidos vecinos por extensión directa o diseminación a través de vasos linfáticos o sanguíneos. Los cánceres sólidos tienen un crecimiento anormal produciendo una tumoración que es evidente por palpación o a simple vista.

Se considera que un tumor esta constituido por dos etapas :

- 1.- Una etapa en la que las células se dividen constantemente.
- 2.- Otra etapa donde las células capaces de dividirse están en estado de reposo.

El crecimiento del tumor depende de la presencia relativa de cada una de estas etapas. El tumor se caracteriza por la acumulación de células anormales, lo que implica una ausencia de control en el crecimiento celular.

Las células neoplásicas son menos diferenciadas que la célula normal. En muchos casos entre más indiferenciada es una célula cancerosa es más agresiva, aunque depende del tejido de donde provenga el tumor (1).

#### 2.1.2 Terminología

Los sinónimos de tumor maligno son : cáncer, neoplásia,

blastoma, carcinoma y enfermedad oncológica. La terminación "oma" es común en tumores benignos.

### 2.1.3 La Evolución del Cáncer

Uno de los datos más antiguos relacionados al cáncer aparece en los papiros egipcios del siglo XV A.C. En los cuales se describen ulceraciones de piel resistente a todo tipo de tratamiento y que se extienden a otras partes del cuerpo, y terminan con la muerte. En la poca de Hipócrates siglo IV A.C. existen evidencias de tumores óseos. En el hombre Neolítico y en América en restos de un inca precolombino se hallaron marcas atribuibles a un melanoma. En 1938 Johannes Muller comprueba que los tumores están formados por células que derivan de células anormales que por diversos factores comienzan a proliferar, este investigador sugería que existía una causa que transformaba la célula normal en cancerosa. Laúnnec 1815 sostiene que cualquier tejido puede dar lugar a un cáncer y que las células del tumor llevan el sello del tejido de origen. Con el Siglo XX comienza la Era de tratamientos más científicos y racionales del cáncer basados en el conocimiento histológico y en el de su evolución clínica. En 1910 Peyton Rous aisló de un tumor el virus del Sarcoma de Rous. En 1920 Yamagiwa e Itchikawa produjeron cánceres en orejas de conejo con pincelazos de alquitrán, haciendo lo mismo con otras sustancias sospechosas de ser cancerígenas. En la década de los 40's Carlos Huggias demostró que algunas hormonas intervienen en el proceso de cáncer de organos genitales (2).

### 2.1.4 Ciencias involucradas

El estudio del cáncer se ha realizado a diferentes niveles: citológico, morfológico, molecular, metabólico, inmunológico y a nivel de la diferenciación celular (1).

La Biología Molecular ha permitido penetrar en el metabolismo

intimo de la célula y de sus organelos. El microscopio electrónico, la enzimología moderna, la utilización de compuestos radiactivos en la Bioquímica, el estudio de los ácidos nucleicos y los avances en la Biología Molecular y la Genética han ido descubriendo los mecanismos de la transformación de una célula normal a cancerosa y sus etapas en la progresión del proceso.

Actualmente los estudios se encaminan a dilucidar como se rompe el equilibrio regulatorio que mantiene controlada a la reproducción celular, son procesos bioquímicos complejos donde los diferentes agentes cáncergenos como son virus, hormonas, contaminantes ambientales, radiaciones, etc, pueden romper ese equilibrio y desencadenar la neoplasia.

Las investigaciones se efectuan a diferentes niveles etiológicos, patológicos y clínicos (2).

Durante los últimos veinte años, los avances en la investigación han logrado dilucidar algunos mecanismos de la carcinogénesis (3).

Muchos factores influyen en la probabilidad de la detección y naturaleza del cáncer así como la disponibilidad médica para su tratamiento (4).

### **2.1.5 El Cáncer Colorectal**

El CC continúa siendo uno de los más comunes y la segunda causa que lleva a la mortalidad en países desarrollados y en México ocupa el catorceavo lugar (5). En pacientes con CC cerca del 40% desarrollan metástasis hepática (6). El cáncer de colon y de recto varían en tratamiento, sintomatología y pronóstico, el 40% de estos tumores son rectosigmoideos (1).

## **2.2 EPIDEMIOLOGIA**

### **2.2.1 En Cáncer Colorectal**

Se ha determinado que por lo menos un miembro de cada familia

tiene la posibilidad de adquirir cáncer. Las características de una enfermedad maligna varían con el sexo, edad, raza y ubicación geográfica. Existe una mayor predisposición de desarrollar cáncer en el sexo femenino que en el masculino, sin embargo, esta diferencia esta disminuyendo debido al incremento del cáncer pulmonar en los hombres y el decremento del cáncer cervicouterino. Las neoplásias más frecuentes en mujeres son : mama, colon, útero y piel. En el hombre son : pulmón, tracto intestinal, piel, prostáta, cavidad oral, laringe y vejiga. En niños el problema del cáncer es menor pero crece la mortalidad en casos como : leucemia, tumores cerebrales, renales y linfomas (7).

La incidencia y la región afectada en CC varía con la edad y sexo. Se ha observado un aumento de la incidencia en el lado derecho en personas de más de 65 años. En el cáncer de colon de lado izquierdo en personas de menos edad. En el lado distal es mayor que en el proximal tanto en personas jóvenes como adultas (8). Los polipos y los tumores CC tienen aproximadamente la misma distribución, sus diferencias residen en que el CC tiene un mayor porcentaje en la unión rectosigmoidea y el polipo es más frecuente en el colon descendente y transversal.

El Instituto Central de Estadística de la Secretaria de Salud (1988), confirmó que el CC ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad en ambos sexos. Las estadísticas también indican que el CC ocurre 3 a 4 veces más frecuente en pacientes que están afectados por formas esporádicas en el intestino que la población en general, no se han observado pruebas contundentes de herencia del CC (5). En México en la actualidad la incidencia anual de CC supera los 120 000 casos nuevos, el adenocarcinoma de colon es más prevalente en los países desarrollados, se ha comprobado que las personas que emigran a una determinada región geográfica adquieren el riesgo. Existe mayor frecuencia de aparecer CC en la raza blanca que en la raza negra, en zonas urbanas que en zonas rurales, en el hombre es más frecuente el cáncer rectal y en cáncer de colon la proporción entre hombres y mujeres es

aproximadamente la misma. La incidencia del CC ha permanecido relativamente estable en algunos países como Inglaterra, mientras que en otros como EUA y Dinamarca ha aumentado debido tal vez al desarrollo de la población. En Japón se ha observado un aumento de la incidencia en la última década, derivado tal vez por la occidentalización de la dieta, en diferentes grupos religiosos también existe variación, el riesgo existente es mayor en los judíos comparado con los adventistas del 7o. Día, teniendo origen estas variaciones en los diferentes regímenes dietéticos (9). Se considera que existe aproximadamente 6.35 millones de casos nuevos al año, varios países como efecto protector consumen fruta fresca y vegetales (10). El carcinoma rectosigmoide se considera de alta proporción en el cáncer del intestino en poblaciones de alto riesgo (9). En México se hicieron hace algunos años estudios epidemiológicos que reportaron que el CC puede iniciarse entre los 15 y 19 años, teniendo desarrollo de 5 veces entre los 40 y 44 años, con un pico máximo entre los 60 y 64 años, se observó también que aproximadamente un 50% de hombres padecen CC y un 49% en mujeres, se observa una ligera tendencia aumentada en el sexo masculino, aunque esta diferencia no es muy significativa (103).

### 2.2.2 Estudios Epidemiológicos

La realización de estudios epidemiológicos es sobre poblaciones diferentes en cuanto a exposición, tiempo de introducción de factores de riesgo y vías de operación. Además tales poblaciones adquieren la dieta tradicional de países con alto riesgo de CC (10). Los progresos en el campo del cáncer son fundamentados en la investigación clínica y de laboratorio, también se incluyen investigaciones en Etiología, Pronóstico, y Tratamiento apoyados en los avances de la Genética Molecular, Biología Celular, Carcinogénesis, Virología e Inmunología (3). Los epidemiólogos han observado que el CC está muy relacionado con el medio ambiente; su hipótesis es que los factores ambientales como

dieta y costumbres afectan el tiempo de exposición del carcinógeno al tejido (11). La frecuencia del CC se muestra en la tabla 1.

TABLA 1 INCIDENCIA DEL CC SEGUN LA EDAD	
EDAD (años)	PORCENTAJE (%)
20-29	5
30-39	16
40-49	50
50-59	98

En niños y adolescentes el porcentaje de CC es menor del 5% y es frecuente en el sexo masculino. Los adenocarcinomas frecuentes en jóvenes son los mucilaginosos y son lentos en su progresión (1). Los epidemiólogos analíticos creen que la prevención es fácil cuando la causa es conocida (10).

### 2.3 FACTORES DE RIESGO

#### 2.3.1 Reseña

Estudios epidemiológicos indican que los factores ambientales como compuestos químicos, radiaciones y virus juegan un papel importante en la mayoría del cáncer humano lo que implica que esta enfermedad es prevenible, se han desarrollado métodos para visualizar si compuestos químicos encontrados en el lugar de trabajo, dieta u otras fuentes causan daño al ADN. La alteración de expresión de genes y de la actividad de las proteínasas, pueden indicar métodos para detectar la acción de promotores en cáncer humanos, para la determinación de la etiología de la enfermedad (3). Se ha visto que los contaminantes ambientales son múltiples y dependiendo de la naturaleza y cantidad, tiempo y frecuencia de exposición y características biológicas del

individuo, son los efectos que causan en el individuo (2).

### 2.3.2 Dieta

Datos epidemiológicos obtenidos de cánceres humanos muestran que el exceso en la ingesta de lípidos, proteínas y carbohidratos tienen influencia en la incidencia del cáncer. La dieta rica en estos compuestos influye en el crecimiento del tumor por su efecto en los factores de crecimiento y niveles hormonales en el tejido (12). Una dieta rica en carne y grasa animal está asociada con alto riesgo de CC, ya que puede inducir un alto flujo de esteroides y ácidos grasos en el intestino que podrían ser metabolizados a productos secundarios por la flora bacteriana, algunos de estos productos como el colesterol se ha observado que actúa como cocarcinogeno (5). Los hábitos alimenticios que producen irritaciones, inflamación, indigestión, y se tornan crónicos provocan trastornos haciendo más susceptible al intestino para los agentes cancerígenos, lo mismo ocurre al ingerir líquidos o alimentos sobrecalentados (2). Los cancerígenos son formados durante el procesado de los alimentos, estos compuestos pueden ser pirolizinas, pirobenceno y aminos heterocíclicas que se liberan del asado de carnes y pescados, el café y la salsa de soya también tienen acción mutagénica, así como los alimentos tratados con nitritos. Otros compuestos cancerígenos son colorantes alimenticios, saborizantes, edulcorantes, espesores, emulsificadores, enzimas, preservativos, manteguilla amarilla (N,N-dimetil-4-aminobenceno), pesticidas clorados, de mecanismo de acción aún desconocido (12). Los factores dietéticos influyen en el metabolismo de los ácidos biliares que están asociados con los procesos cancerosos, en el colon proximal, donde los metabolitos biliares están en un estado dinámico. La mayoría de estos efectos puede ser de gran importancia para el colon distal donde está la mayor parte de la función de la fermentación. En CC se observa como factor de riesgo el alto consumo de grasas y como factor protector el consumo de fibra, el consumo de huevos se ha tratado

de relacionarlo con el CC proximal pero no ha sido demostrado plenamente, otro factor relacionado con este tipo de CC es la frecuencia de la ingesta, si es mayor hay mayor liberación de bilis. Factores muy frecuentes en el CC proximal y distal son las comidas fritas, salsas, alimentos procesados, carnes asadas, alto consumo de huevo, y grasas (14). El cáncer de colon se encuentra disminuido al consumir fibra de grano, y el cáncer de recto se encuentra disminuido al consumir fibra de frutas y vegetales. Existe un mecanismo hipotético donde la fibra tiene un efecto sobre los metabolitos cancerígenos de los ácidos biliares, de ha observado que la fibra de grano está relacionada con la proliferación celular, llevandose a cabo la disminución del tumor, la fibra de frutas y vegetales afecta la fermentación de los ácidos grasos tratando de mantener una concentración de esteroides y ácidos grasos estable y así proteger al intestino (15). Existe una correlación entre estado de hiponutrición y avitaminosis con el cáncer del tubo digestivo. Estudios recientes han asociado una mayor incidencia de CC con altos niveles de consumo de colesterol en la dieta y un efecto protector a la vitamina A (2). En pacientes malnutridos existe una elevación de la glucosa hepática que está relacionada con niveles de hormona de crecimiento y por consiguiente con CC (16). Los resultados de los estudios recomiendan que una dieta prudente podría ser la que contenga bajo contenido de grasas y carne con un alto contenido de frutas y vegetales (14). La disminución de proteína en la dieta puede disminuir la actividad de oxidasas microsomales que puedan llevar a la formación cancerígenos. La fibra en la dieta tiene un papel protector en el desarrollo del CC (4). En Inglaterra se ha registrado que existe menor proporción de cáncer intestinal grueso en poblaciones con alto consumo de leche y de alimentos con frutas y vegetales, en comparación con dietas ricas en proteínas y grasas las cuales se les atribuyen efectos favorables para el desarrollo del CC (2). El papel protector de los vegetales no se ha comprobado pero se cree que proporciona beneficios a la

flora microbiana al fermentarse en el colon. En los crustáceos se ha detectado un compuesto tipo indol que puede tener propiedades antitumorales, también el calcio tiene un efecto benéfico en la mucosa colonica (14). Los carotenoides y el ácido ascórbico tienen propiedades protectoras y el consumo de té es de alto riesgo por su contenido de taninos que son mutagénicos (17).

### 2.3.3 Factores Ambientales

Existen diversos factores ambientales tales como la dieta, grado de urbanización, agentes químicos, físicos y biológicos que son importantes en la patógenesis del CC. Los factores químicos que están directamente relacionados con acción carcinogénica son: Hidrocarburos policíclicos, aminas, nitrosaminas,  $\beta$ -metilamina, bencidina, compuestos mostaza, uranio, estroncio, níquel, berilio, asbesto, tabaco, y algunos productos del procesamiento de alimentos. La acción del carcinógeno puede ser facilitada por: solventes que faciliten el transporte de este a través de la mucosa, inducción de enzimas que lleven a la bioactividad del carcinógeno así como la asociación de la malnutrición y la inmunosupresión del huésped (12). El significado de formación endógena de compuestos nitrosos ha sido estudiada en personas con riesgo a cáncer gástrico en Japón, basandose en la excreción de p-nitrosoprolina, el cual es un producto de la nitración endógena, encontrandose que existe una relación de la nitración endógena con la malignidad, otro proceso que tiene el mismo comportamiento es la acetilación. (10). El tabaco contiene sustancias como el benzopireno, antraceno, nitrosaminas, nicotina, etc que ocasionan toxicidad general y efectos cancerígenos en los tejidos.

Las fuentes más importantes de tóxicos químicos urbanos son : El humo de fábrica y talleres, la incineración de asbestos, los gases de escape de los vehículos, productos polvosos de aserraderos, calefacción, descomposición de la basura, desechos orgánicos, etc. Los agentes más importantes son los residuos

carbonosos del humo, que también contienen derivados hidrocarbonados del alquitrán y del petróleo, los conservadores, colorantes, fertilizantes químicos a base de nitratos, urea, y otros derivados nitrogenados, y plaguicidas químicos que contaminan los alimentos cuando sobrepasan los límites permitidos. La aflatoxina es una tóxica micótica que induce la producción de tumores malignos, los derivados del antraceno, pireno, y colantreno son los más agresivos en la producción de cánceres experimentales, debido a que pueden producirse potenciadores. Las sustancias lipídicas como el colesterol y otras grasas que refuerzan la acción tumorigénica de los hidrocarburos policíclicos, el alcohol aumenta el riesgo de cáncer digestivo, sobretudo en localizaciones altas boca, faringe, esófago y laringe, la hiponutrición que acompaña a los alcohólicos es también un factor de riesgo agregado. Las drogas a veces tienen acción tumorigénica o de transformación celular en dosis muy elevada. Existen medicamentos que solo el médico debe indicar y controlar ya que su posible riesgo cancerígeno varía según las condiciones fisiopatológicas del paciente como las hormonas que son elementos de gran valor en la terapéutica. Se ha observado que los estrógenos favorecen la aparición de tumores en animales experimentales bajo ciertas condiciones.

Ciertos virus actúan como agentes de cancerización sobretudo en terrenos predisuestos, el virus se encuentra en el tejido tumoral o bien se detectan expresiones inmunológicas debidas a su presencia, la acción combinada de agentes cancerígenos y de virus desarrolla cánceres mucho más rápidamente. Los retrovirus y los papovavirus son los más frecuentes.

Los agentes físicos más frecuentes son los rayos X,  $\gamma$  y UV, su interacción con el ADN provoca las mutaciones que se traducen en transtornos metabólicos celulares (2).

#### 2.3.4 Enfermedades Benignas

Un polipo es producto de una multiplicación celular no

controlada, se encuentra localizado, no invade tejido, semejante a las células que le dieron origen y que pueden desarrollar una función normal. Existen evidencias clínicas epidemiológicas, patológicas y experimentales indicando que algunos polipos pueden convertirse en cáncerosos (5). Factores de riesgo muy importante son: pacientes con previo CC, adenomas colorectales, colitis ulcerativa, poliposis, Síndrome de Gardner, síndromes colorectales no asociados a poliposis (9). Se ha encontrado que una gran proporción de CC es por el desarrollo de malignización de tumores benignos llamados polipos. La incidencia de polipos esta aumentada de 70 a 74 años y la de CC 75 a 79 años en ambos sexos. Los neoplasmas colonicos son más frecuentes en mujeres y los rectales son más frecuentes en hombres. Las familias que tienen antecedentes de poliposis tienen mayor riesgo de padecer CC (5). Los adenomas al crecer de tamaño aumentan la posibilidad de que se produzca una displasia premaligna y un carcinoma. La distribución anatómica de los adenomas guarda relación con el potencial maligno, los del colon descendente, distal y sigmoide presentan una mayor frecuencia de convertirse en malignos que es lo mismo que ocurren en CC comparado con otras regiones del colon. Para disminuir el riesgo es necesario remover los adenomas con frecuencia. Las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerativa se relaciona con dos variantes, la colitis activa y la extensión de los cambios inflamatorios en el colon, los pacientes con Enfermedad de Crohn se encuentran también en riesgo de contraer CC, este riesgo es principalmente importante cuando, la enfermedad dura más de 15 años, se inicia antes de los 21 años, y afecta todo el colon. En la Colitis Ulcerativa Crónica el riesgo se relaciona con la duración de la enfermedad (9), también se encuentra asociado con la longitud de la mucosa afectada (18). Se han observado también que exhibe un aumento en los niveles de los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ha-ras (22). En el caso de la Poliposis Familiar el riesgo es alto ya que todos los individuos terminan por padecer CC (9), esta enfermedad presenta

disminución de los alelos del brazo largo del cromosoma 5 al igual que en los adenocarcinomas de colon (20). Se considera un marcador de riesgo en la poliposis familiar el aumento de niveles de la citocromo C oxidasa (21). El Síndrome de Gardner y el Síndrome de Peutz-Jehers son trastornos de tipo genético autosómico dominante de expresión genética variable. Estos síndromes son considerados de alto grado de riesgo de padecer CC, el Síndrome de Turcot es una poliposis del colon asociada a tumores malignos del sistema nervioso central. Las poliposis juveniles pueden ser precancerosas. Las mujeres con CC presentan un riesgo elevado de padecer cáncer de mama, endometrio y ovario (9). En los tumores carcinoides la malignidad está asociada con el tamaño, en CC existe evidencia de una herencia con rasgo autosómico dominante (9). Los polipos colonicos son conocidos como lesiones premalignas con una alta incidencia de CC al aumentar de tamaño, aunque esto es relativo (13).

### 2.3.5 Factores Generales

Los factores que llevan a predisponer a CC son poco entendidos, el cáncer intestinal es uno de los pocos tumores que presentan un modelo autosómico dominante de herencia bien definido. Recientes estudios sugieren que los factores genéticos están limitados a pocas familias, la contribución de estos en la patogénesis del cáncer es difícil de evaluar principalmente por los factores ambientales involucrados (5). El riesgo de padecer CC comienza a aumentar ligeramente a los 40 años y de forma brusca a los 50 años doblandose con cada década y alcanzando su máximo entre los 75 y 80 años. En cuanto al sexo solo tienen diferencias de ser más frecuente en colon en la mujer y recto en el hombre. Se ha comprobado que el CC que aparece antes de los 30 años es muy agresivo y que la edad y la clasificación de Duke's varían en la misma forma que lo hace la graduación histológica. Aunque el CC no se ha considerado una enfermedad ocupacional se ha encontrado un

riesgo aumentado en los trabajadores de la industria del asbesto, goma, textil, y embalsadores, también hay una asociación positiva de CC con el grado de urbanización (5). Los pacientes que han padecido un CC no están excluidos de un riesgo alto, aún cuando el CC haya sido tratado. El CC ocasiona otro tipo de cáncer como es el de mama (21%), sistema ginecológico (16%), y genitourinario (11%) (9). La edad es considerado un factor de riesgo importante en el CC (11).

## 2.4 ETIOLOGIA

### 2.4.1 Por diversos aspectos

la causa exacta del cáncer aún permanece sin ser determinada totalmente, existen causas directas como son los notables carcinógenos químicos, las radiaciones, las dietas ricas en grasas animales y el bajo consumo de fibra. Es conocido que las interacciones de una célula con un carcinógeno son influidas por una variedad de factores nutricionales, el tipo de dieta, la frecuencia, la dosis y la exposición al carcinógeno. Muchas drogas, insecticidas, y xenobióticos en la dieta inducen la activación de ciertos sistemas enzimáticos para la introducción del carcinógeno a la célula, por ejemplo fenobarbital y DDT (12).

Los factores ambientales principalmente la dieta desempeñan un papel importante en la etiología del CC. En poblaciones con baja incidencia de CC también presentan baja incidencia en apendicitis, adenomas, diverticulosis, y colitis ulcerosa. La dieta rica en fibra y baja en carbohidratos reduce el tiempo de trastornos intestinales por lo cual cualquier carcinógeno potencial permanece menos tiempo en contacto con la mucosa intestinal. La fibra aumenta gradualmente el volumen intraluminal y por lo tanto diluye los carcinógenos que normalmente se ingieren en los alimentos y se hallan presentes en el conducto intestinal; la grasa tiene una relación directa con la incidencia de CC, el

suplemento de la dieta con ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol disminuyen la mutagenicidad y los niveles de nitrosaminas en heces. En la mujer los acontecimientos de la vida reproductiva pueden modificar el riesgo subsiguiente de que aparezca un CC, los cambios que acompañan el embarazo pueden servir como protección contra este tipo de cáncer, debido a que la secreción de ácidos biliares y colesterol en suero están disminuidos. Se ha sugerido que el consumo rico en crustáceos protege al intestino grueso del cáncer así como la ingestión de fibra, vegetales ricos en vitamina A, ácido ascórbico y selenio (9). En la génesis del CC también está asociado el desarrollo de polipos, la importancia de factores ambientales en la patogénesis de CC está enfatizada en el aumento de la incidencia de la enfermedad en países industrializados y migrantes de región de bajo, riesgo a regiones de alto riesgo, en áreas geográficas de concentración bajas de selenio en el suelo aumentan la incidencia de CC, ya que enzimas como la Glutación-peroxidasa requiere de este metal (9). Los hábitos también influyen en la etiología de CC como es el consumo de alimentos calientes, no triturar correctamente los alimentos con los dientes y con alto contenido de picante (10). El aumento de la actividad de la ODC (ornitina decarboxilasa) por inductores como son los ácidos grasos, sales biliares y diacilglicéridos aumentan la severidad del CC (20). También asociados a la etiología están la malnutrición, pérdida del peso, aumento de la glucosa hepática y hormona de crecimiento (16). Existe un alteración denominada carcinoide rectal y su origen parece ser debida a alteraciones endócrinas (23). Los procesos inflamatorios como causal del CC se han tratado de explicar debido a que los procesos irritativos crónicos son factores de predisposición a la aparición de la transformación maligna, dichos procesos pueden ser : persistencia de lesiones, úlceras, eczemas, quemaduras traumatismo, infecciones, etc (2). La etiología por radiación es frecuente en radiólogos, mineros, trabajadores de la industria nuclear, y los sobrevivientes de Hiroshima y Nagasaki (9). El daño genético

suplemento de la dieta con ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol disminuyen la mutagenicidad y los niveles de nitrosaminas en heces. En la mujer los acontecimientos de la vida reproductiva pueden modificar el riesgo subsiguiente de que aparezca un CC, los cambios que acompañan el embarazo pueden servir como protección contra este tipo de cáncer, debido a que la secreción de ácidos biliares y colesterol en suero están disminuidos. Se ha sugerido que el consumo rico en crustáceos protege al intestino grueso del cáncer así como la ingestión de fibra, vegetales ricos en vitamina A, ácido ascórbico y selenio (9). En la génesis del CC también está asociado el desarrollo de polipos, la importancia de factores ambientales en la patogénesis de CC está enfatizada en el aumento de la incidencia de la enfermedad en países industrializados y migrantes de región de bajo, riesgo a regiones de alto riesgo, en áreas geográficas de concentración bajas de selenio en el suelo aumentan la incidencia de CC, ya que enzimas como la Glutación-peroxidasa requiere de este metal (9). Los hábitos también influyen en la etiología de CC como es el consumo de alimentos calientes, no triturar correctamente los alimentos con los dientes y con alto contenido de picante (10). El aumento de la actividad de la ODC (ornitina decarboxilasa) por inductores como son los ácidos grasos, sales biliares y diacilglicéridos aumentan la severidad del CC (20). También asociados a la etiología están la malnutrición, pérdida del peso, aumento de la glucosa hepática y hormona de crecimiento (16). Existe un alteración denominada carcinoide rectal y su origen parece ser debida a alteraciones endócrinas (23). Los procesos inflamatorios como causal del CC se han tratado de explicar debido a que los procesos irritativos crónicos son factores de predisposición a la aparición de la transformación maligna, dichos procesos pueden ser : persistencia de lesiones, úlceras, eczemas, quemaduras traumatismo, infecciones, etc (2). La etiología por radiación es frecuente en radiólogos, mineros, trabajadores de la industria nuclear, y los sobrevivientes de Hiroshima y Nagasaki (9). El daño genético

podría ser el responsable del desarrollo de diversos tipos de cánceres, la predisposición hereditaria, la aparente relación de la susceptibilidad para el cáncer, la poca habilidad para reparar el ADN dañado, el potencial de los carcinógenos y la alteración de los protooncogenes son factores muy importantes en la etiología del CC (25).

#### 2.4.2 Mecanismos

Los tumores pueden ser iniciados por cambios en los mecanismos regulatorios, adquiriéndose un aumento en el potencial de crecimiento (24). Las grasas de la dieta aumentan la excreción y degradación de los ácidos biliares y sus metabolitos que pueden actuar como potenciadores de los carcinógenos y aumentar la proliferación bacteriana, cuya actividad enzimática del tipo  $\beta$ -glucuronidasa y azoreductasa metabolizan los esteroides y ácidos grasos a productos secundarios que actúan como carcinógenos. Las nitrosaminas están presentes en heces de individuos que consumen una alta proporción de carne de ternera (9). La col y la coliflor inducen actividad a enzimas como hidrolasabenzopireno, las oxidasas de la mezcla microsomal son capaces de activar a los carcinógenos al convertirlos de lipofílicos a hidrofílicos y así penetrar a sistemas acuosos de reacción (12). Las bebidas alcohólicas tienen un mecanismo no muy claro pero se cree que modifica la flora fecal o bien la concentración de esteroides fecales (9). Una cantidad baja en fibra produce un tránsito lento del contenido fecal y así permite un tiempo más prolongado de contacto de los carcinógenos con la mucosa. Se ha sugerido que la fibra puede ligar carcinógenos aumentando el volumen de excremento y así diluir el carcinógeno. Las bacterias anaeróbicas principalmente los Bacteroides metabolizan sales biliares en compuestos potencialmente carcinógenos (9). Los agentes irritantes

en contacto prolongado con la mucosa pueden romper el equilibrio de factores que regulan la multiplicación celular (2).

## 2.5 SINTOMATOLOGIA

### 2.5.1 Transtornos funcionales

Los tumores CC crecen, obstruyen, se ulceran y sangran, invaden estructuras vecinas, producen dolor y con frecuencia horadan órganos vecinos o cavidad peritoneal. Los rasgos clínicos que se manifiestan en el individuo dependen de las características biológicas del crecimiento canceroso y de la localización del tumor en el interior del colon, pueden ser intermitentes y sutiles y muchas veces poco consideradas por el individuo y el médico (9). Los signos de alarma son variables como son trastornos de las deposiciones, ritmo de las mismas, constipación anormal, dolores en la defecación, tenesmo, deposiciones viscosas, presencia de sangre en heces, oclusión intestinal, palpación de una masa en el hipocondrio derecho, adelgazamiento, anemia, estreñimiento, ulceración, obstrucción, necrosis, invasión serosa, anorexia y pérdida de peso (1). La rectorragia es un síntoma frecuente en cáncer de colon izquierdo y de recto, en el cáncer de colon derecho la hemorragia es lenta y mezclada con el contenido intestinal y el paciente se va aneminizando progresivamente, presentando déficit de hierro, tornandose débiles con mareos, insuficiencia cardiaca congénita y heces color marrón. Los pacientes con cáncer en el colon ascendente experimentan un intenso dolor debido a que la válvula ileocecal se encuentra obstruida. Algunos pacientes presentan diarrea cuando el contenido del colon atravieza las partes cancerosas en forma forzada, los espasmos se agravan después de las comidas como consecuencia del aumento de la actividad peristáltica. Es característico de los cánceres rectales la aparición de tenesmo rectal, pequeñas hemorragias. La perforación que el CC produce en la cavidad

peritoneal suele dar lugar a un absceso localizado, esto puede causar fiebre intermitente, signos de irritación y dolor abdominal. En los CC avanzados se presenta anorexia que se intensifica en las lesiones que ocasiona una obstrucción parcial, produciendo dolor abdominal y anemia relacionada por la debilidad y el malestar. En el CC con metástasis los síntomas dependen del órgano afectado (9). Los cánceres de colon de lado derecho presentan síntomas en forma tardía por ser muy grande su lumen intestinal y haber gran fluidez del contenido intestinal (4). Cuando el CC perfora el tejido produce la diverticulosis, y cuando se ha extendido más allá de los confines del intestino puede producir fistulas rectovaginales, la extensión intraabdominal puede causar una obstrucción (9). Entre los síntomas más frecuentes de unos días a un año son : sangrado rectal, constipación, diarrea, y dolor abdominal antes del diagnóstico (5).

#### 2.5.2 Expresión de moléculas antigénicas frecuentes

La presencia de ACE (antígeno carcinoembrionario) en suero originalmente sugería un valor en CC, desafortunadamente se ha demostrado que solamente es significativa en estados avanzados, según la clasificación de Duke's el estado A presenta un 5%, el B un 25%, y el C y D presentan un 80-90%. El uso de la determinación de ACE es para pacientes con metástasis y monitoreo de pacientes postoperatorios (9).

### 2.6 ANATOMIA PATOLOGICA

#### 2.6.1 Macroscopía

El carcinoma del intestino grueso adopta por lo general las siguientes configuraciones macroscópicas : exofítico, ulceroso, infiltrativo o anular. La localización rara vez modifica el tipo de configuración, la ulceración local es signo macroscópico de

malignidad en un adenoma. Las lesiones infiltrativas tienen mejor pronóstico que las exofíticas, los carcinomas anulares producen obstrucción, cambios del ritmo intestinal y hemorragias cuyo pronóstico es el menos favorable. Los carcinomas ulcerativos pueden originarse como tumores polipoides, no obstante a medida que progresa la infección y necrosis se produce una perforación que aumenta el mal pronóstico de este tipo de carcinoma. Los tipos de adenocarcinomas son: nodular, vellosa, mucóide y escirroso (9). La presencia de criptas aberrantes es característico de lesiones preneoplásicas (26).



FIGURA 1. MACROSCOPIA DE UN CARCINOMA COLORECTAL

#### 2.6.2 Microscopía

Los CC muestran diferentes grados de semejanza con el tejido de origen según los grados de diferenciación :

A. Bien diferenciados : Las células neoplásicas se disponen en

malignidad en un adenoma. Las lesiones infiltrativas tienen mejor pronóstico que las exofíticas, los carcinomas anulares producen obstrucción, cambios del ritmo intestinal y hemorragias cuyo pronóstico es el menos favorable. Los carcinomas ulcerativos pueden originarse como tumores polipoides, no obstante a medida que progresa la infección y necrosis se produce una perforación que aumenta el mal pronóstico de este tipo de carcinoma. Los tipos de adenocarcinomas son: nodular, vellosa, mucosa y escirrosa (9). La presencia de criptas aberrantes es característico de lesiones preneoplásicas (26).



FIGURA 1. MACROSCOPIA DE UN CARCINOMA COLORECTAL

### 2.6.2 Microscopía

Los CC muestran diferentes grados de semejanza con el tejido de origen según los grados de diferenciación :

A. Bien diferenciados : Las células neoplásicas se disponen en

acúmulos asiformes que simulan las criptas glandulares de la mucosa del tejido normal. Estos tipos presentan un mejor pronóstico.

b. Moderadamente diferenciados : Las células tienen citoplasma más oscuro que el normal y un núcleo hiper cromático.

C. Poco diferenciados : Las células neoplásicas se presentan en masas y cordones irregulares, a menudo se dificulta la identificación de su origen.

Los grados menores de diferenciación celular implican un crecimiento rápido y por lo tanto un curso fulminante de la enfermedad con un mal pronóstico como es el caso del CC no diferenciado (9). En el microscópio electrónico se observa la membrana aberrante con formación de tipo glicopeptídica. Los núcleos son voluminosos con contornos irregulares y cromatina fina, nucleolos numerosos y citoplasma pequeño (1).

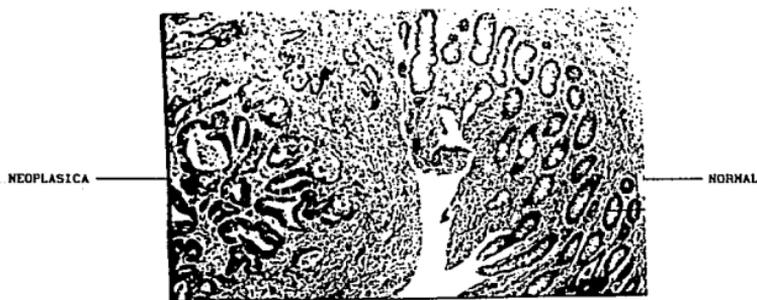


FIGURA 2. MICROSCOPIA DE UN CARCINOMA COLORECTAL

### 2.6.3 Histología

Los rasgos histológicos que se relacionan con la enfermedad

comprenden el grado de diferenciación, la penetración mural, la presencia o ausencia de ganglios afectados linfáticos, infiltración linfática y venosa, y presencia de respuesta inmunológica. Los estudios histológicos son útiles para el diagnóstico definitivo del CC. Las propiedades cariotípicas y metabólicas se modifican en el curso de la evolución del tumor (9).

#### 2.6.4 Metabolismo

La mayoría de cánceres CC son adenocarcinomas los cuales son microscópicamente similares a sus contrapartes, son más frecuentes los bien diferenciados y los que secretan pequeñas cantidades de mucina (9). El papel inmunológico que tienen las CD (células dendríticas) en el CC es que son células presentadoras de antígeno y son reconocidas por los linfocitos T, las cuales desencadenan la respuesta inmunológica, estas CD se encontraron en mayor concentración en la periferia del tumor que en la parte central, en tumores primarios y en el tejido normal adyacente prácticamente no se encuentran (27). La expresión de ARNm del FNT (factor de necrosis tumoral) se ha encontrado que no ha sido relacionada con el estado de la enfermedad, grado de infiltración linfocítica, grado de diferenciación del tumor, necrosis del tumor ni con el pronóstico del paciente. Aunque se ha encontrado ARNm de FNT en un gran número de muestras de pacientes con CC, se cree que el ARNm del FNT es expresado por las células cancerosas como parte del proceso tumorigénico (28). Un marcador de diferenciación es la determinación del antígeno y presencia de la actividad enzimática de sucrasa-isomaltasa en CC (29). En el desarrollo tumoral se observan pérdidas de antígenos de membrana y aparición de especificidades antigénicas así como la aglutinación por ciertas lectinas (1).

En el CC se ha observado aumento de la producción de glucosa hepática, este hecho se encuentra relacionado con la disminución

de peso, desnutrición y aumento de los niveles de hormona de crecimiento (16). Durante el desarrollo del tumor existen cambios catalíticos de algunas enzimas como es el caso de la ODC que en el CC presenta una mayor afinidad y rapidez por el sustrato en comparación con el tejido normal adyacente (20). Otras enzimas alteradas son las fóstasa ácida, alcalina hexosaminidasa, hexafosfato-inositol y la difluorometilornitina, que parecen afectar la promoción del CC (26). Se han encontrado altos niveles de citocromo C oxidasa subunidad III en CC bien diferenciados comparados con los moderadamente y poco diferenciados; se observa que al aumentar la malignidad disminuyen dichos niveles, el mecanismo es aún desconocido (21). Un fenómeno observado en las células cancerosas es el de Warburg que consiste en la acumulación de ácido láctico de la glicolisis anaeróbica que realizan estas células. Las anomalías más frecuentes en las células tumorales son : exceso o disminución de una o varias enzimas, trastornos en la regulación de la actividad enzimática. Con la producción alterada de glicoxidasa y neurominidasas adquieren las células neoplásicas la capacidad de invadir los tejidos vecinos. En cultivos in vitro tienen un crecimiento irregular y pierde la inhibición por contacto creciendo en forma descontrolada (1).

## 2.7 CLASIFICACION DEL CC

### 2.7.1 Clásica

Los tumores se pueden clasificar en dos grandes grupos por sus características de crecimiento:

A. Benignos : En general tienen un crecimiento limitado, localizados, y derivan de los trastornos mecánicos que puede ocasionar un cuerpo extraño en el seno de un tejido normal.

B. Malignos : se caracterizan por un crecimiento descontrolado y rápido por ser invasivos tanto en sitio donde se han iniciado como en la capacidad de diseminación a otros tejidos del organismo, sus

efectos son mortales si no es tratado a tiempo.

Estas definiciones no son absolutas existen tumores benignos que por su localización son peligrosos y malignos que crecen muy lento y que rara vez dan metástasis. Es posible que tumores benignos evolucionen a malignos como son los adenomas del colon, dependiendo de factores hormonales, inmunológicos, y procesos que favorecen la aparición de la neoplasia como son la inflamación, irritación y vascularización anormal. La malignidad está dada por la diferenciación celular, velocidad de crecimiento, características morfológicas y diseminación. Los tres primeros son características histológicas y se usan números romanos para expresar el grado de malignidad en una neoplasia, el orden creciente de los números se corresponde con el grado de malignidad (1). La producción de mucina también se ha tratado de relacionar con la malignidad pero aún no se ha demostrado plenamente (9).

#### 2.7.2 Por su tipo histológico

Se basa normalmente en tres factores esenciales que son el grado de diferenciación, la actividad mitótica, y el polimorfismo celular. En el primer caso se dividen en bien, moderado y poco diferenciados dependiendo de su diferencia con el tejido de origen (1). Los bien diferenciados están formados en su mayoría por estructuras glandulares provista de núcleos que presentan una polaridad y orientación basal, los moderadamente diferenciados son glandulares con una pequeña pérdida de la polaridad y la orientación nuclear y los poco diferenciados tienden a formar láminas y nidos, perdiendo la polaridad y orientación nuclear. De los tumores poco diferenciados hay dos variantes los CC en forma de anillo de sello y los muciláginosos cuyo pronóstico es nefasto (9). Los tumores poco diferenciados presentan poca cantidad de antígeno Mu-9 en CC (30) también estos tumores tienen la capacidad de adhesión a sustrato de laminina disminuida (31). El tumor bien diferenciado presenta una expresión aumentada de COI (citocromo C

oxidasa subunidad I) comparada con los moderados y poco diferenciados (21). La resistencia a las células naturales citotóxicas presenta una relación inversa al grado de diferenciación y a la susceptibilidad a estas células. La correlación que existe entre el grado de diferenciación y la distribución de ACE, es que en los CC bien diferenciados se ha observado altos niveles de ACE en el tumor y bajos niveles en plasma. En tumores colorectales moderados y poco diferenciados se encuentran altos niveles de ACE en plasma y bajos en los tumores (32).

#### 2.7.3 Por su origen tisular

Los tumores CC derivados del tejido epitelial son denominados carcinomas o epitelomas, los tumores que se derivan del mesénquima se les denomina sarcomas y los que surgen de las glándulas del colon se llaman adenocarcinomas. La mayoría de CC son adenocarcinomas de varios grados de diferenciación y algunos son muciláginosos (1).

#### 2.7.4 De acuerdo a Duke's

Basada en el aspecto patológico, se trata de relacionar con el grado de sobrevivencia y se divide en:

- A : Confinada a la mucosa y submucosa, no penetra la capa muscular. Su frecuencia en CC es del 15%
- B : Se refiere a tumores que han penetrado la pared muscular, se divide en B1 ( atravieza capa muscular) y B2 (atravieza capa muscular y serosa sin invadir ganglios linfáticos). Representa en CC el 35%
- C : Similar a B2 pero invade ganglios linfáticos. Y su frecuencia es de un 50%
- D : Semejante a C pero presenta metástasis distantes.

La sobrevivencia relacionada con esta clasificación se observa en la tabla 2.

TABLA 2 SOBREVIVENCIA DE PACIENTES CON CC DE ACUERDO A LA CLASIFICACION DE DUKE 'S	
Estado de Duke's	Sobrevivencia en 5 años (%)
A	75-80
B1	50-60
B2	23-30
C	20
D	5

Est clasificación corresponde a la de Duke's modificada por Astler y Collar (1, 9).

## 2.8 PROCESO CARCINOGENICO

### 2.8.1 Iniciación

Los cánceres humanos son debidos a interacciones complejas entre múltiples factores incluyendo la combinación de acciones de agentes químicos y virales, el proceso se lleva a cabo en etapas de iniciación, promoción y progresión, donde la transición entre estos estados se maneja por diferentes factores ambientales y endógenos, también involucran diferentes mecanismos bioquímicos y genéticos. La iniciación se produce cuando un agente químico o viral se unen covalentemente al ADN de la célula huésped, se activan protooncogenes en procesos como amplificación, transposición, traslocación, mutaciones puntuales, deleciones etc. Se alteran actividades enzimáticas como las de proteínasas que modifican la membrana citoplásmica, iones, receptores, expresión de genes y cambios en la diferenciación y proliferación celular. En los CC los ácidos biliares pueden activar estos eventos enzimáticos. La iniciación solo requiere de una simple exposición al carcinógeno y aparece el ADN dañado, la promoción necesita múltiples exposiciones del agente que no dañan al ADN

directamente pero si otros procesos celulares, y la progresión es el resultado de estos eventos. Existen sinérgismos entre agentes virales y químicos. Hay agentes tanto iniciadores como promotores, un promotor es el TPA (éster de forbol), la iniciación es irreversible (3,44). La poliposis se ha considerado como en estado precanceroso. Al llevarse a cabo la iniciación, la célula adquiere capacidad independiente de la proliferación, invasión y metástasis (25). La colitis ulcerativa caracterizada por episodios recurrentes de inflamación, y con actividad proliferativa aumentada es un estado precanceroso (18). Durante la iniciación se lleva a cabo un etapa llamada "periodo de latencia" es el lapso que se lleva a cabo desde el momento del contacto con el cancerígeno y la aparición del tumor, este tiene un tiempo variable dependiendo de la dosis, tiempo de exposición, dieta, susceptibilidad, etc. En la etapa inicial aparecen las células neoplásicas el proceso puede seguir por dos caminos : detenerse o formarse la masa tumoral (2). Muchos CC pueden surgir de adenomas, y tener alteraciones genéticas en el oncogen ras, deleciones en cromosomas 5, 17 y 18 (33). La transformación y la diferenciación son producidos por cambios en los modelos de la expresión de genes los cuales determinan el fenótipo del CC (21). Los promotores también forman sinérgismo con los oncogenes y así disminuyen el tiempo de latencia (34).

### 2.8.2 Progresion

La progresión es un evento que involucra la conversión de tumores benignos en malignos y se puede considerar un proceso abierto donde los tumores continúan su grado de malignidad y heterogéncidad y que podría requerir de un futuro daño al ADN. La progresión Peyton y Rous la describen como " el proceso por el cual un tumor va de malo a peor" y para su mejor entendimiento se requiere de más estudios en cuanto a formación de metástasis (3). En la progresión las funciones de los genes supresores de tumores se encuentran inactivadas (35). La glucólisis está alterada, la respiración está aumentada, el transporte de glucosa se encuentra

incrementado y la actividad de algunas enzimas como los citocromos están disminuidas, se lleva a cabo el fenómeno de Warburg. Los daños de los protoncogenes pueden producirse en diferentes niveles y se efectúa una cooperación entre los protoncogenes activados (25,49). Los procesos de fosforilación son los más afectados y son cruciales en la progresión (36,37). Los factores de crecimiento tanto en sus receptores como en su función están involucrados en la proliferación descontrolada del crecimiento (38), producto de la adquisición de una autonomía por parte de las células cancerosas (24). En la progresión se llevan a cabo las etapas de enfermedad localizada, regional y diseminada, la promoción y la progresión son procesos reversibles (2). Ocurre primero la extensión local por infiltración de las células cancerosas en los tejidos vecinos y posteriormente la extensión del tumor por vía linfática y hemática. Para esto es necesario la producción de hialuronidasa y proteasas. La progresión sigue un modelo de crecimiento exponencial geométrico, donde los ciclos celulares se reproducen a un ritmo fijo sin existir pérdidas celulares, describiendo una curva de tipo Gompertziano (1). Otro proceso de la progresión es la producción de glucosa hepática aumentada en CC (16). La ODC se encuentra en altos niveles se cree que aumenta el desarrollo del tumor aunque el mecanismo aún no se encuentra descrito (20). Las propiedades de proteínas de adhesión también se modifican como es el caso de vinculina,  $\alpha$ -actina y de esta manera no responden a los controles normales de crecimiento (34). Los mecanismos más alterados son a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional, transducción de señales. Otros aspectos como el metabolismo de esteroides, inmunológicos, hormonales, factores de crecimiento y oncogenes (40). Para la transformación es necesario que por lo menos dos oncogenes se encuentren activados (41). Existen variaciones en el ciclo celular en el CC por ejemplo la fase S tiene mayor duración siendo un signo de malignidad (42). La cantidad de ADN en tumores es de naturaleza aneuploide o heteroploide relacionandose con el grado

de malignidad del tumor (9). Las células malignas de CC presentan insensibilidad a la acción del oxígeno debido a los bajos niveles de la enzima Superóxido dismutasa, otras actividades enzimáticas afectadas son las de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y enzimas de la vía de las pentosas (43). Otros eventos de CC son la secreción de mucina, migración de células, expresión de marcadores tumorales y maduración de sistemas enzimáticas (9).

### 2.6.3 Mecanismos celulares contra el proceso

Las acciones celulares de los carcinógenos pueden ser inhibidos en principio por varias vías incluyendo la inhibición de compuestos nitrosos al formar aductos, la inhibición del sistema enzimático de las oxidases, los inhibidores de la dieta, como es la fibra que diluye la concentración de carcinógenos (12). Los cultivos de CC bien diferenciado responden con inhibición del crecimiento al adicionarles el factor de crecimiento TGB- $\beta$  no así los otros tipos de tumores (44). Las células naturales citotóxicas cuya función es la de vigilancia inmunológica en CC se encuentra en relación inversa con el grado de diferenciación. Se cree que es por la cantidad de ácido siálico que es mayor en los CC bien diferenciados (29). Las poliaminas ( putresina, espermidina, y espermina) son esenciales para la proliferación celular en CC se encuentran elevados sus niveles pero son independientes del sitio del tumor y grado de diferenciación. El mecanismo se explica porque en CC los niveles de ODC se encuentran elevados y esta es una enzima que interviene en la formación de las poliaminas (45). La proliferación de la célula cancerosa es autónoma, progresiva e irreversible :

**Autónoma** : es insensible a los estímulos reguladores del organismo.

**Progresiva** : al evolucionar el tumor va presentando diferentes características celulares, diferentes grados de diferenciación, y aparición de aberraciones cromosómicas.

**Irreversibles** : la mayoría de los cánceres proliferan en ausencia

de tratamiento hasta la muerte del paciente. No es absoluta la irreversibilidad, dependiendo de los procesos inmunológicos, el desarrollo a formas letales (1).

#### 2.8.4 Expresión de moléculas antigénicas

El desarrollo de CC involucra también la expresión de varias moléculas como la presencia de villina con niveles incrementados, que ayuda a la vascularización aumenta la necrosis y la muerte de la célula tumoral (48). Los glicosfingolípidos pueden estar presentes o ausentes en las células tumorales y están involucrados con los procesos de división celular. En los tumores el citoesqueleto se encuentra desorganizado y una causa es por la disminución de fibronectina y F-actina; por lo tanto la adhesión se encuentra disminuida y así ocurre la metástasis (12). La presencia del ACE en CC tiene una distribución uniforme y en CC fue uno de los marcadores que primero se describieron. En estados muy avanzados se encuentra aumentada en plasma. (30,32). El nivel aumentado de ARNm de los activadores de plásmínogeno están asociados al desarrollo del tumor y la metástasis (12). La actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa (GGT), está aumentada en CC (24). La presencia de ARNm de laminina en CC puede ser indicador de la progresión y agresividad del tumor, también la transcripción del FNT está disminuida (31). La cantidad de receptor de laminina cuya función es el control limitante de la adhesión celular a laminina en la membrana basal, se encuentra alterada (46). Los antígenos asociados a CC son GICA (antígeno gastrointestinal canceroso), SSEA (antígeno específico del estado embrionario), y el antígeno LEA (antígeno largo externo) son también detectados en suero (7). Se sugiere que el FNT que aparece en estados neoplásicos favorece la progresión del tumor (9).

## 2.9 METASTASIS

### 2.9.1 Mecanismo

La invasión intracelular se define como la intrusión de un

tejido en el espacio ocupado por un segundo tejido. La está invasión es mejor conocida como el mecanismo para la invasión local de un tejido neoplásico (47). La metástasis se produce por la migración de células neoplásicas de un tumor primario, a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos que al implantarse en otro tejido se inicia el crecimiento de un tumor denominado secundario o metastásico, las metástasis pueden ser únicas o múltiples (2).

Estudios clínicos con anticuerpos monoclonales radiactivos han detectado metástasis distantes cuya reactividad es similar al tumor que les dio origen (48). Las alteraciones de las proteínas de superficie y glicoproteínas juegan un papel clave en el comportamiento de células metastásicas tumorales. En CC el contenido de ácido siálico presenta una relación directa con la potencia de la metástasis y el potencial de malignidad, la muerte del paciente con CC está correlacionada con la extensión del tumor invasividad y metástasis. La alteración de las glicoproteínas y los glicolípidos de la membrana son importantes en funciones biológicas tales como, interacción célula-célula, regulación de crecimiento, diferenciación, transferencia de malignidad y metástasis tumoral, la actividad de enzimas como la neuraminidasa y hialuronidasa están aumentadas y relacionadas con el potencial metastásico (49).

El mecanismo de la metástasis se describe en varias en etapas: en la primera ocurre el derrumbamiento de la membrana basal por la acción de la enzimas neuraminidasa, hialuronidasas, gluconidasas, permitiendo a las células separarse del tumor primario y extenderse a las vías de circulación; también en esta etapa el tumor se recubre de fibrina para evadir la respuesta inmune e inmortalizar las células tumorales en el sistema microvascular. Los activadores de plásmínogeno y sus inhibidores están implicados en la formación y ruptura de está cubierta de fibrina, la acción de los activadores impiden la formación de dicha cubierta, también tienen función en el proceso de la angiogénesis para la formación de nuevos vasos sanguíneos para el

tumor recién formado, en este caso los activadores presentan una actividad elevada. La otra etapa es la implantación de las células neoplásicas en otros tejidos, las cuales crecen descontroladamente formándose la masa tumoral, al cual se le denomina tumor secundario (50).

### 2.9.2 En Cancer colorectal

Las metástasis más frecuentes de CC son hepáticas, son generalmente grandes y de necrosis central, simples o múltiples, uno o múltilobulares, e incluso ocupan el 75% del parénquima hepático. Los porcentajes de metástasis más frecuentes en CC se muestran en la tabla 3.

TABLA 3 METASTASIS MAS FRECUENTES EN CC	
ORGANO	METASTASIS (%)
Hígado	23.8
Peritoneo	17.6
Pulmón	8.5
Intestino Delgado	5.7
Genitales Internos	5.6
Vejiga Urinaria	4.4
Hueso	2.7
Cerebro	2.6

Las metástasis no están relacionadas con la clasificación de Duke's (6,9,51,52).

### 2.9.3 Procesos celulares involucrados

Los receptores de laminina en la superficie celular están involucrados con la migración del tumor y metástasis que es la mayor causa de morbilidad y mortalidad para pacientes con cáncer. En CC los niveles de laminina y sus receptores están incrementados y correlacionados con la invasividad y metástasis.

Actúan a nivel de la extensión y migración celular, crecimiento celular, diferenciación y mitogénesis. La metástasis hepática también presenta altos niveles de estas moléculas, que sirven como marcadores de agresividad biológica (31).

## 2.10 MARCADORES TUMORALES

### 2.10.1 Concepto

Los marcadores tumorales son aquellas moléculas que se presentan en los diferentes etapas de la carcinogénesis, en diferentes concentraciones y que tienen las siguientes características:

- Específico para cáncer
- Producción directamente relacionada a la masa tumoral
- Detectable en pequeñas cantidades
- De metabolismo moderadamente rápido
- Suficientemente estable

Ninguno de los marcadores tumorales es posible que sean únicos para cáncer, pero son productos que son detectados en uno u otro tejido o en estado de desarrollo fetal. Si el marcador es detectable en pequeñas cantidades proporciona más información que un estudio de gabinete, es importante que el marcador sea utilizado en el monitoreo, progresión y regresión de la neoplásia.

En ciertas circunstancias la determinación del marcador tumoral puede ser usado para confirmar el diagnóstico o discernir entre la población de riesgo a progresión de cáncer (53).

### 2.10.2 En cáncer colorectal

El ACE es un marcador que se investiga rutinariamente para el seguimiento de pacientes con cáncer en el tracto gastrointestinal, fue aislado por primera vez de intestino fetal humano y tejido de colon canceroso por Gold y Freedman en 1965, es una glicoproteína con peso molecular de 200 Kd. En tejidos normales la cantidad de ACE es baja, se encuentra en la superficie de casi la totalidad de

los tumores glándulares del tubo digestivo y de sus metástasis, tanto en el seno tumoral como en el suero. Este compuesto no es específico de cáncer porque se encuentra alterado también a niveles de lesiones inflamatorias y tumores benignos (1). El ACE es uno de los marcadores más importantes en el diagnóstico y monitoreo del CC (30). La concentración de ACE, CA-19.9 y CA 125 en el tejido tumoral está aumentada en comparación con el tejido normal y ha sido correlacionada con el estado de la enfermedad y la diferenciación del tumor, los bien diferenciados son los que exhiben más cantidad de ACE comparados con los moderados y poco diferenciados. Pacientes con CC que presentan negatividad para el ensayo de ACE se pueden identificar con CA 19.9, el CA 125 es raro en CC (54). La diferencia entre el ACE de tejido normal y tumoral es cuantitativo. Waneger demostró que los niveles de ACE en plasma son muy elevados cuando el tumor muestra una considerable necrosis (32). En pacientes con altos niveles de ACE desarrollan metástasis pulmonar; al aumentar los niveles el pronóstico del paciente es peor (53). Los niveles de ACE en la sangre suelen elevarse con la progresión del tumor y disminuir en su regresión (9). La presencia de villina proteína de peso molecular 45 Kd está correlacionada con la malignidad del CC e indica el estado patológico, los niveles de villina están incrementados en relación directa con la clasificación de Duke's, la villina es un marcador de diferenciación (48). También existen los antígenos denominados oncofetales debido a que son antígenos de superficie que se expresan en la etapa fetal y en condiciones tumorales un ejemplo de estos es el ácido siálico (12). La fibronectina es un marcador bioquímico de diferenciación, la elevación de los niveles de F-actina está relacionada con la alteración del citoesqueleto que pueden servir como marcadores sensibles para fenotipos transformados (12). En CC se han encontrado altos niveles de ODC, este compuesto se usa como marcador de severidad de la enfermedad y está en relación directa al aumentarse la clasificación de Duke's. En la terapia postoperatoria se usa como criterio de tiempo

de sobrevivencia la cual aumenta al disminuir los niveles de ODC (20). Los niveles incrementados de los receptores de laminina juegan un papel en metástasis hematológica y son marcadores de agresividad biológica de las metástasis (31). La laminina es una glicoproteína de alto peso molecular es un marcador de alteración celular, expansión celular, morfogénesis, mitogénesis, diferenciación y metástasis (46).

Un ensayo que se pretende sea marcador de riesgo de transformación, es medir el índice de marcado por  $H^3$ -timidina de la duración de la fase de síntesis de ADN, al aumentar el índice de marcado refleja un aumento en el crecimiento y acortamiento del ciclo celular (42). El antígeno de larga extensión, ALE encontrado en colon y epitelio biliar fetales, se encuentra elevado en CC y puede ser detectado en suero, sin embargo se requieren más estudios para su correlación con la progresión del tumor (7). Los niveles incrementados de las enzimas B y L-cisteinaproteasa, son marcadores de la progresión en CC y están aumentadas en etapas tempranas como es el estado de Duke's A comparado con los estados B, C, y D (58).

### 2.10.3 Alfa-fetoproteína

La AFP ( $\alpha$ -fetoproteína) es una globulina fetal muy importante en el embrión, pero desaparece con rapidez después del nacimiento, su concentración normal en el suero adulto es de 20 ng/ml. Aparece en altos niveles (1000-3000 ng/ml) en cáncer primario de Hígado, teratoblastoma, metástasis hepáticas, tumores gastrointestinales, hepatitis viral y cirrosis (96). El marcador tumoral de AFP se ha usado en Hepatocarcinomas principalmente, y es cuantificada en suero (97). La producción alterada de AFP está asociada con el desarrollo, regeneración, eventos carcinogénicos y exposición a agentes hepatotóxicos. Se proponen cuatro funciones de AFP en la vida fetal.

- 1.- Como albumina fetal
- 2.- Control de la respuesta inmune (inmunosupresora)

3.- Bloqueo de efectos de estrógenos

4.- Factor de control del crecimiento intracelular

La aplicación de anticuerpos contra AFP en el embarazo causa abortos o malformaciones del feto. El aumento de AFP está usualmente asociada con células malignas, progresión, crecimiento del tumor y metástasis. La producción de AFP está relacionada con tumores que surgen del endodermo como gastrointestinales y pulmonares, no ha sido estudiada ampliamente y no se ha encontrado ninguna relación con la historia clínica del paciente. Los niveles de AFP se han utilizado para el monitoreo del crecimiento tumoral y efectos de la terapia (101). En CC se encuentran altos niveles de NANA (ácido N-acetilneuramínico) y ACE. Estos niveles están relacionadas con el curso y progresión de la enfermedad (98). Se ha reportado un CC en el cual la paciente se encontraba en estado de gestación y mostraba altos niveles de AFP en suero (6.2 veces más que el nivel normal). Existen otras enfermedades donde los niveles de AFP se encuentran elevados como es el caso de hepatitis, infecciones mononucleosas, tumores en hígado, tumores de estómago y colon (99). En líneas celulares de colon como Caco-2 los niveles de AFP están incrementados (100). En pocos casos de CC con metástasis hepática se observa también dicho incremento (102).

## 2.11 ONCOGENES

### 2.11.1 Reseña

La oncología es el estudio de la enfermedades neoplásicas. Los protoncogenes son genes normales celulares cuya función en algunos es aún desconocida, cuando por mutaciones como deleciones, mutaciones puntuales, amplificaciones, deregulaciones, sustituciones, inserciones, etc, se activan se les denominan oncogenes. Los antioncogenes son genes normales de la célula cuya función es detener el crecimiento tumoral, también se les denomina "genes supresores de tumores" entre ellos se encuentran p53 y Rb (59,61). Los protoncogenes son cruciales en regulación de

crecimiento y diferenciación celular, son genes muy conservados a lo largo de la evolución y al ser mutados contribuyen a la transformación neoplásica de la célula (35,60). La clasificación de los oncogenes se divide en nucleares, citoplásmico y citoplásmico-nucleares, según su acción en la célula. Los nucleares son : las familias myc, myb, fos, jun y ski; los citoplásmicos están integrados por las familias ras, src, erb B, neu, ros, abl. Cambios en los protooncogenes implican alteraciones en la regulación de crecimiento (63). Los oncogenes están asociados con procesos cancerosos y se asocian con alteraciones en el crecimiento normal de la célula, la transformación maligna, en donde el metabolismo normal de la célula se observa alterado, el papel preciso de los oncogenes es aún desconocido (41).

En CC los oncogenes más frecuentes son c-myc, c-fos y c-Ki-ras (35). Se considera que la presencia de estos oncogenes tiene relación con el potencial de la enfermedad. Se necesita más la presencia de más de un oncogen para que se lleve a cabo la carcinogénesis debido a su naturaleza multietapas y multifactorial (62).

### 2.11.2 Los oncogenes en la carcinogénesis

Los oncogenes pueden actuar a lo largo de todas las etapas del cáncer : en la promoción y en la progresión de la neoplasia. Los oncogenes más fuertemente asociados a la proliferación son src, abl, ras y myc (60). Los mecanismos a través de los cuales los oncogenes participan en la transformación maligna son :

- 1.- Acción de las oncoproteínas en el ciclo celular en un tiempo inapropiado. También actúan como interruptores en los mecanismos de regulación del crecimiento (63).
- 2.- Oncoproteínas que actúan sobre factores de crecimiento y receptores de estos, permitiendo a la célula un crecimiento autocrino.
- 3.- Oncogenes que codifican para proteínas que afectan los mecanismos de fosforilación y transducción de señales, que

participan como segundos mensajeros.

- 4.- Oncoproteínas nucleares cuyas mutaciones llevan a la pérdida de elementos regulatorios transcripcionales y también actúan como mitógenos.
- 5.- Derregulación de oncogenes cuya amplificación afecta el crecimiento celular o que suprime la respuesta de genes reguladores de crecimiento.
- 6.- Inactivación de genes supresores de tumores (66).

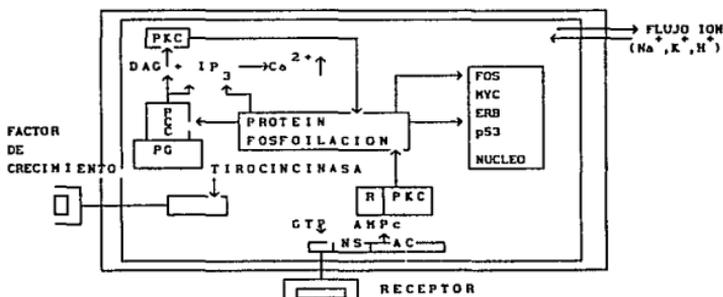


FIGURA 3. ACCION DE DIFERENTES ONCOGENES EN LA CELULA. PKC (PROTEINASINASA C), DAG (DIACILGLICERIDOS), Ac (ADENILATOCICLASA), IP3 (1,4,5, INOSITOLTRIFOSFATO) Y PL-ASA C (FOSFOLIPASA C) (3).

En CC se han encontrado alteraciones a nivel ADN y ARN en los oncogenes myc, ras y fos. En la como la cooperatividad de los oncogenes se cree que el producto de uno podría estabilizar o incrementar la expresión del otro (65). En esta neoplásia la mutación del gene ras se encuentra muy frecuentemente en eventos tempranos del proceso (33) y en la progresión las alteraciones más frecuentes son de myc, fos y p53 (60). En estudios con muestras de CC se ha observado que un 50% muestran una sobreexpresión en

alguno oncogen y que la presencia de altos niveles de ARNm de alguno de los oncogenes arriba mencionados está correlacionada con la agresividad del tumor (22).

### 2.11.3 Factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y oncogenes.

Existen factores de crecimiento que se activan con oncogenes como ras, mos, src, provocando la formación de factores de crecimiento no regulados o mutados. los factores de crecimiento autónomos que la célula tumoral sintetiza proporcionan una autoestimulación o crecimiento autocrino. Los receptores aberrantes pueden actuar como proteínas oncogénicas que actúan en un flujo en el citoplasma y el núcleo estimulando al crecimiento celular. En etapas tempranas de diferenciación y desarrollo de la regeneración celular, las mutaciones en los receptores llevan a una proliferación no controlada. La división celular se origina cuando los receptores nativos se unen a los factores de crecimiento PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidermal) y las células se tornan "competentes" la alteración tanto de receptores como factores de crecimiento afectan el ciclo celular (64). Las células tumorales tienen menor dependencia de factores de crecimiento para su promoción, adquieren una parcial o total autonomía. Los mecanismos que se han propuesto para la acción de los oncogenes con los factores de crecimiento y sus receptores son:

- 1.- Ruta autocrina que lleva a la deregulación de la célula y se convierte en un estado activo de la división celular.
- 2.- Otro camino es que los oncogenes confieren autonomía a los factores de crecimiento que bombardean continuamente a la célula con señales estimulatorias de crecimiento.
- 3.- Los genes nucleares myc y fos controlan la regulación anormal de los factores de crecimiento (66)
- 4.- Los receptores de PDGF y EGF activan las tirosincinasas

intracelulares y proteincinasas .

La acción de los factores de crecimiento en la tumorigénesis, se presenta en un estado tardío de la progresión después de los eventos de transformación (66,67,68)

#### 2.11.4 Oncogenes que afectan transducción de señales y mensajeros intracelulares.

Muchos protooncogenes codifican para proteínas encontradas en la membrana plasmática y en el citoplasma, las cuales actúan como detectores y generadores de señales químicos en células normales ("segundos mensajeros"). La importancia de estos radica en que actúan a nivel de la regulación de la proliferación celular y las mutaciones que alteran dichas vías inducen un crecimiento inapropiado (59), una vía importante es la de las proteínas que unen GTP, las cuales son de tres clases: proteínas G, factores de elongación y las proteínas de la familia de ras (69).

Se han encontrado formas mutadas de ras en tumores animales y humanos, c-Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras son oncogenes que codifican para proteínas p21, es decir proteínas de peso molecular de 21 Kd (61). La familia ras sufre mutaciones puntuales en los codones 12, 13, 59 y 61, en el cáncer de estómago es frecuente la mutación de c-Ki-ras en el codón 13 (70). La proteína p21 es membranaral con actividad intrínseca de GTPasa y capacidad de transducción de señales a través de la membrana, su mutación puntual le confiere propiedades transformadoras, en etapas tempranas de la neoplasia junto con deleciones de 5q, 17q y 18q (33). Los oncogenes c-Ha-ras y c-Ki-ras fueron aislados por primera vez de un sarcoma de rata de los oncogenes virales Harvey y Kirsten. En la célula normal, p21 une GTP al igual que la célula transformada pero está última hidroliza el GTP 8-10 veces menos que la normal, existe relación con la activación de adenilatociclase y p21 que pueden ser parte del control de la división celular (60). La proteína GAP de 120 Kd, se ha propuesto como un regulador de la proteína ras (80),

intracelulares y proteincinasas .

La acción de los factores de crecimiento en la tumorigénesis, se presenta en un estado tardío de la progresión después de los eventos de transformación (66,67,68)

#### 2.11.4 Oncogenes que afectan transducción de señales y mensajeros intracelulares.

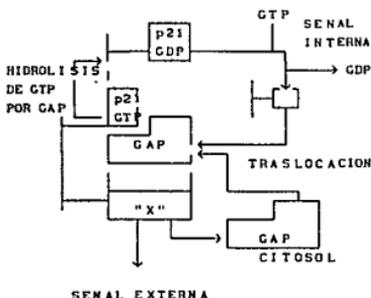
Muchos protooncogenes codifican para proteínas encontradas en la membrana plasmática y en el citoplasma, las cuales actúan como detectores y generadores de señales químicas en células normales ("segundos mensajeros"). La importancia de estos radica en que actúan a nivel de la regulación de la proliferación celular y las mutaciones que alteran dichas vías inducen un crecimiento inapropiado (59), una vía importante es la de las proteínas que unen GTP, las cuales son de tres clases: proteínas G, factores de elongación y las proteínas de la familia de ras (69).

Se han encontrado formas mutadas de ras en tumores animales y humanos, c-Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras son oncogenes que codifican para proteínas p21, es decir proteínas de peso molecular de 21 Kd (61). La familia ras sufre mutaciones puntuales en los codones 12, 13, 59 y 61, en el cáncer de estómago es frecuente la mutación de c-Ki-ras en el codón 13 (70). La proteína p21 es membranaral con actividad intrínseca de GTPasa y capacidad de transducción de señales a través de la membrana, su mutación puntual le confiere propiedades transformadoras, en etapas tempranas de la neoplasia junto con deleciones de 5q, 17q y 18q (33). Los oncogenes c-Ha-ras y c-Ki-ras fueron aislados por primera vez de un sarcoma de rata de los oncogenes virales Harvey y Kirsten. En la célula normal, p21 une GTP al igual que la célula transformada pero está última hidroliza el GTP 8-10 veces menos que la normal, existe relación con la activación de adenilatociclase y p21 que pueden ser parte del control de la división celular (60). La proteína GAP de 120 Kd, se ha propuesto como un regulador de la proteína ras (80),

cuyo mecanismo es:

- 1.- Interacción p21-GTP que es considerado el complejo activo.
- 2.- Este complejo es llevado hacia la membrana e interactúa con otras proteínas llevandose a cabo el evento de transducción de señales para el proceso de la multiplicación celular
- 3.- El complejo p21-GTP se une a la proteína GAP para incrementar el potencial de hidrólisis de GTP a GDP.
- 4.- Se genera el complejo p21-GDP inactivo, la p21 transformada no es reconocida por GAP para formar el complejo inactivo quedando constantemente activa, transduciendo señales y así la célula se mantiene en un ciclo celular permanente (60,73,74,75).

A. CELULA NORMAL



B. CELULA TRANSFORMADA

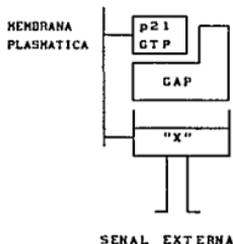


FIGURA 4. ACCION DE p21 EN LA CELULA (A) CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE p21 EN UNA CELULA NORMAL. (B) ACTIVIDAD DE LA p21 MUTADA DONDE LA PROTEINA GAP SE UNE A P21 PERO NO ES ESTIMULADA LA CONVERSION DE GTP A GDP Y EL COMPLEJO PERMANECE EN UN ESTADO ACTIVO CONSTITUTIVAMENTE (59).

En experimentos realizadas por Mc Cormick ha comprobado que las p21 estimulan la síntesis de ADN y la proliferación celular

(73), en células transfectadas con los oncogenes ras y src se observó que se produce un incremento de glucosa y de ARNm del transportador de glucosa, lo que produce un fenotipo de célula transformada de mecanismo desconocido. Se sugiere que estos oncogenes tienen un papel en la regulación de transporte de glucosa (39). Existe una relación entre la expresión de p21 y el aumento de la proliferación celular dependiendo de la presencia del agente promotor. Existen otros eventos relacionados y que es la pérdida del contacto, rearrreglos en el citoesqueleto, estimulación del crecimiento y división celular (34).

Se han encontrado correlaciones entre los niveles de p21 y grado de invasividad del tumor, se postula como modelo una posible mutación en el promotor del oncogen c-Ki-ras induciendo la invasividad (78,79). La incidencia de ras en cáncer humano es la tabla 4.

TABLA 4 INCIDENCIA DE RAS EN CANCER HUMANO		
Tumor	Incidencia	ras
Pulmón	30%	Ki-ras
Colon	50%	Ki-ras
Páncreas	90%	Ki-ras
Seminoma	40%	Ki y N-ras
Melanoma	20%	N-ras
Mieloide	30%	Ki,Ha y N-ras

c-Ki-ras tiene cooperatividad con los oncogenes nucleares en CC (59).

En experimentos de transfección del oncogen c-Ha-ras en cultivos de CC poco diferenciados, se ha observado que adquieren resistencia a las células naturales citotóxicas y características de diferenciación, es decir tienden a diferenciarse. El mecanismo es aún desconocido (29).

La alteración del oncogen c-Ki-ras en CC es principalmente

una mutación puntual en el segundo nucleótido del codón 12, produciendo una conversión de una G a T. Esta alteración es independiente de edad, sexo, raza, localización anatómica, grado de diferenciación o estado de Duke's (22,56,70,72,76). Por estudios experimentales se ha encontrado que los niveles de ARNm de c-Ki-ras aumentan de acuerdo a la clasificación de Duke's y en algunos casos de CC se ha encontrado una ligera sobreexpresión (61,77).

#### 2.11.5 Productos de oncogenes en citoplasma

Las proteínas de src de peso molecular 60 Kd fueron las primeras en describirse, tienen actividad de tirosincinasas, se sabe que afectan el metabolismo de los fosfolípidos, la expresión de src está muy relacionada con la diferenciación y proliferación celular (60). Su nombre proviene de Rous Sarcoma Virus y consiste de 12 exones (56). Existen c-src y v-src cuyas diferencias residen en la habilidad de transformar células (82).

La actividad de tirosincinasa de pp60src es capaz de catalizar la fosforilación de una variedad de sustratos y juega un papel crítico en la transformación celular. Su alteración se ha localizado principalmente en el aminoácido 433 esto tiene como consecuencia la no regulación de la actividad enzimática de proteincinasas (36,81). Esta oncoproteína está involucrada en la actividad catalítica del AMPc dependiente de proteincinasas, al aumentar los niveles de AMPc se produce estimulación de la división celular (37). Se propone que transducen señales de división celular a través de segundos mensajeros al núcleo.

En las células normales los segundos mensajeros tienen una vida media corta, las proteincinasas al ser activadas por los promotores tumorales (esteres de forbol), provocan que la vida media de los segundos mensajeros se prolonge, produciendo una constante señal de división celular y por lo tanto de la proliferación celular.

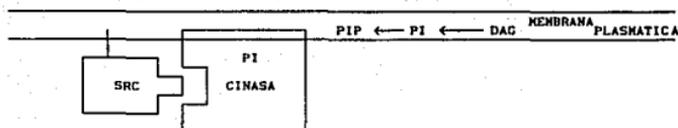


FIGURA 5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ONCOGEN SRC EN LA PROTEÍNCINASA (PI-CINASA) Y LA CASCADA DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL CRECIMIENTO CELULAR (60).

El oncogen *src* se encuentra muy involucrado con eventos mitóticos, aumento de la fosforilación, disminución de la adhesión y comunicación entre célula-célula (60). La mutación en el carboxilo terminal de las proteínas de *src* son importantes para el potencial oncogénico, de tal manera de asegurar una eficiente expresión de la proteína transformante y contribuir a la carcinogénesis. El papel de pp60src en la progresión del CC es en etapas tempranas cuando se inicia la formación de la masa tumoral (63).

#### 2.11.6 Oncogenes nucleares

Los oncogenes nucleares son los de las familias *myc*, *myb*, *jun*, *fos*, *erb A*, y *ski* cuyas oncoproteínas actúan como transactivadores de factores que interactúan con el ADN y estimulan o reprimen la transcripción, también actúan como reguladores centrales de importantes funciones celulares como son la proliferación y la diferenciación. En la tabla 5 se pueden apreciar algunas propiedades de los oncogenes nucleares.

TABLA 5 PROPIEDADES DE LOS ONCOGENES NUCLEARES		
Oncoproteína	Cromosoma	Función
c-myc	8q24	?
c-myb	6q22-24	transcripción
c-fos	14q21-31	transcripción
c-jun	1p31-13	transcripción
c-ski	1q22-24	?

El oncogen c-myc codifica para una proteína de peso molecular de 58 Kd, y es una proteína que se transporta rápidamente al núcleo después de ser sintetizada. La expresión de c-myc está relacionada con la proliferación y diferenciación. c-myc presenta una estructura de tres exones con una región larga codificante de proteína cuyo codón de iniciación es ATG (59). El oncogen c-myc consta de 439 nucleótidos y la región de 106 a 143 y 354 a 433 son indispensables para la capacidad transformante (92). Se ha encontrado este protooncogen en todos los vertebrados y se sabe que se expresa en bajos niveles, su función es desconocida. Los niveles de c-myc muestran cambios en los diferentes estadios de crecimiento y de diferenciación de la célula y presenta en algunas células actividad mitogénica. Existen dos mecanismos de activación del protooncogen de c-myc :

- 1.- Deregulación de la expresión a través de mutaciones o rearrreglos de las secuencias nucleotídicas que constituyen señales para el control de la transcripción, procesamiento y estabilidad del ARNm.
- 2.- Mutación o rearrreglo de la región que codifica para la proteína y que puede llevar a la alteración de las funciones.

La deregulación puede ser causada por inserción viral, mutaciones puntuales, amplificación del gene y translocaciones cromosomales. La alteración de c-myc tiene como resultado la pérdida de la modulación de su expresión la cual participa en la tumorigénesis. La deregulación lleva a la sobreexpresión del oncogen y está con lleva a la célula a un crecimiento autocrino. La función del oncogen podría ser la de un regulador transcripcional, un regulador de la síntesis de ADN, un componente de la maquinaria del procesamiento del ARN, regulador de otros eventos postranscripcionales o bien un componente de la estructura nuclear (59).

La expresión alterada del oncogen c-myc en la Poliposis Familiar indica una predisposición para padecer CC, la

sobreexpresión del oncogen c-myc en pacientes sometidos a cirugía de CC, indica un mal pronóstico para el paciente (56). Erisman y Co. no encontraron relación estadística de la expresión de c-myc con la edad, el sexo, niveles de ACE y estado de Duke's. La mayoría de los CC presentan sobreexpresión del oncogen c-myc (56,86). En CC existe una correlación entre la frecuencia de amplificación de c-myc y el estado del tumor primario que es determinado por parámetros clínicos como malignidad, tamaño, extensión local, y metástasis, es mayor la amplificación del oncogen en estados avanzados y la frecuencia de recurrencia después de la cirugía aumenta en aquellos tumores de CC que presentarán amplificación (84). En CC bien diferenciados se puede reducir la expresión de c-myc al adicionar TGF- $\beta$  (polipéptido endógeno) no ocurriendo lo mismo con los tumores poco diferenciados (44). La expresión de c-myc está aumentado en comparación con el tejido normal de colon de 5-40 veces a nivel ARNm (85).

La represión de c-myc está asociado con la disminución de la proliferación celular y la inducción de un mejor fenotipo benigno en CC (87). Se ha encontrado que los niveles de la transcripción del oncogen c-myc están más incrementados en la parte central que en la periferia en los tumores colorectales (22). Este oncogen coopera con otros oncogenes como ras e induce el fenotipo celular transformado (63). Los niveles de c-myc se han encontrado que aumentan progresivamente: en la mucosa normal, en polipos y en carcinomas (88).

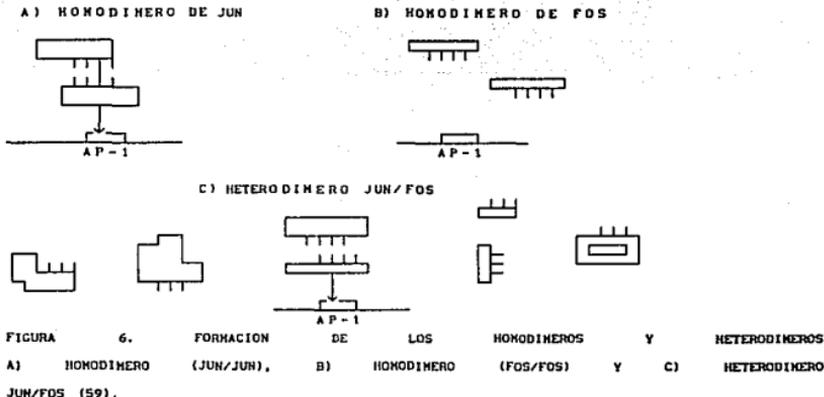
Otro oncogen nuclear, c-myb está implicado en la transformación de células mieloides, su alteración consiste en una deregulación y produce cambios estructurales en su proteína lo cual activan al oncogen, la expresión de c-myb tiende a ser elevada en la fase S del ciclo celular. Su papel puede ser a nivel de replicación o reorganización de la cromatina.

Los oncogenes v-fos y c-fos fueron identificados por primera vez en dos retrovirus murinos ( FBJ-MSV y FBR-MSV), la

oncoproteína de c-fos de peso molecular 55 Kd actúa en controles específicos de expresión de genes como una respuesta integrada a señales transmembranales, este oncogen se activa por :

- 1.- Alteración de la terminación 3' de la secuencia no codificante de c-fos, y como resultado de esta, una expresión elevada del ARNm de c-fos.
- 2.- Incremento de la transcripción produciéndose una expresión constitutiva.
- 3.- Mutaciones puntuales de un ácido glutámico por valina en el residuo 138 es importante para la inmortalización celular.

El oncogen c-fos se expresa normalmente en bajos niveles durante el crecimiento de las células, la acción de mitógenos incrementa los niveles de ARNm hasta 100 veces, en c-fos existen pequeñas secuencias que están definidas como mediadores de respuestas transcripcionales a estímulos específicos, algunos de ellos están involucrados en la regulación de los niveles de transcripción de c-fos y otros juegan un papel en la respuesta a señales transmembranales. El oncogen fos forma un heterodímero con el oncogen jun, el cual se une al factor de transcripción AP-1 del ADN y así induce la transcripción, jun puede formar homodímero (jun/jun) y heterodímeros (jun/fos) pero fos solo forma el heterodímero (fos/jun) con jun, y este heterodímero tiene más habilidad de unirse a AP-1 que el homodímero de jun (jun/jun). Los mecanismos de fosforilación tienen efecto en los oncogenes fos y jun y alteraciones en dichos mecanismos tienen, consecuencia también en la actividad de estos oncogenes nucleares. Los cambios en estos oncogenes afectan la transcripción de las células (59,93).



La inducción de c-fos por factores de crecimiento y otros agentes está relacionada con complejos transcripcionales, sugiriendo que c-fos puede representar una parte parcial de un mensajero vía intracelular que dispara cambios en la expresión de genes y alteraciones fenotípicas. Se ha propuesto que este oncogen actúa como un "tercer mensajero" alterando el proceso de transcripción (84). Se ha observado que c-fos activa genes que llevan a la síntesis del ADN y a la progresión del ciclo celular (60). La región mínima transformante de c-fos es de 25 Kd, es necesario que exista otro evento de mutación para que se lleve a cabo la transformación maligna (63). Los oncogenes que estimulan a c-fos son raf-1, Ha-ras y src (65,67). El complejo de fos/jun en el sitio AP-1 suprime los niveles del gen de la osteocalcina, ácido retinoico y vitamina D3 que son agentes de diferenciación e inhibición del crecimiento (89). Los glucocorticoides son inhibidores de la actividad de AP-1, y el complejo fos/jun es inhibidor de los glucocorticoides, siendo así este un mecanismo de crecimiento y transformación neoplásica (90). El homodímero

jun/jun activa el sitio AP-1, sin embargo el heterodímero fos/jun es mejor activador (91). La regulación del oncogen c-fos es a nivel transcripcional y postranscripcional y su inducción necesita de estímulos continuos por factores séricos. El transporte de la proteína p55 al núcleo es compleja y depende de la estimulación extracelular y se sabe que involucra procesos de fosforilación, AMPc y proteíncinasas (92).

En el CC los niveles de c-fos están elevados de 2 a 8 veces, y este incremento es menor en los polipos (22). Las mitocondrias de las células son diferentes cuando son transformadas por c-fos, son más grandes debido a que los procesos de respiración están incrementados en las células neoplásicas (21). Los niveles de ARNm de c-fos en el núcleo desaparecen totalmente entre 3 y 8 h (92).

#### 2.11.7 Cáncer hereditario y genes supresores de tumores

p53 era considerado en tiempos anteriores como un oncogen, actualmente se ha descubierto que es un gen supresor de tumor. Es una proteína nuclear donde su participación reside en uniones no covalentes oligoméricas complejas con el ADN. En condiciones normales tiene una vida media muy corta (6-30 min) y en condiciones neoplásicas esta vida media se prolonga hasta 100 veces más, esta proteína coopera con el oncogen ras en la transformación. La función de p53 es primordialmente es de antioncogen y en células transformadas pierde esta función.

El gene del retinoblastoma específicamente RB-1 codifica para una proteína que juega un papel en el mecanismo de la tumorigénesis, esta proteína es p105 la cual se une a diferentes oncoproteínas como son las del adenovirus E1A y papilovirus E7. Estos complejos proteína-oncoproteína inactivan su habilidad transformante. Se ha observado que la pérdida de p105 está implicada en la génesis de una variedad de tumores humanos. Se ha propuesto que la proteína de RB-1 como protector de la actividad de las oncoproteínas virales o de sus homólogos celulares (59).

La pérdida de la regulación de genes parece jugar un papel importante de la génesis del cáncer, tales pérdidas pueden ocurrir desde la células germinales y su ausencia predisponer a una susceptibilidad cáncerosa. Muchos genes normalmente operan en una variedad de caminos para limitar el crecimiento celular, actuando bioquímicamente para asegurar que las células no crezcan anormalmente, a estos genes se les denomina " genes supresores de tumores". La mutación de estos genes lleva a una deregulación de algunos oncogenes y a la producción de alelos hiperactivos. La pérdida de su función indica que tienen un papel crítico en la regulación negativa en el control de la proliferación celular.

En el CC la pérdida de algunos cromosomas como el 17p y 5q podría explicar la inactivación de los genes supresores de tumor, debido a que p53 se encuentra en el cromosoma 17p (59). La mutación puntual de alanina por valina en el residuo 135 de p53, hace posible la formación de un complejo con oncogenes como myc o ras y así llevarse cabo la transformación maligna de células (94).

## 2.12 LA CLINICA EN EL CANCER

### 2.12.1 Pronóstico

Se considera un mal pronóstico la presencia de una considerable cantidad de polipos, aumento del número de eosinófilos, linfocitos y células dendríticas (27). Los niveles de ALE y villina están correlacionados con la rápida progresión del tumor (7,55). La presencia del FNT puede ser tóxico al tumor o bien actuar como mitógeno de células malignas (28). La determinación de altas concentraciones del antígeno CA 19.9 indica un pronóstico muy desfavorable y una posible metástasis temprana en CC (54).

### 2.12.2 Diagnostico.

El CC se puede detectar en sus primeros síntomas que consisten en presencia de una protuberancia en el estómago,

hemorragia en orina, dolor inexplicable, fiebre recurrente, pérdida de peso, infecciones repetidas, si es así indica que el CC está localizado (1). El diagnóstico de sangre oculta en heces es un método poco sensible y no confiable (5). Los estudios de gabinete como el rectoscopio, la fibroscopia, la endoscopia, el edema bórico y el proctosigmoidoscopio son los más empleados para el diagnóstico de CC (4). En el CC los niveles de villina están incrementados y puede usarse como un método diagnóstico (48). La determinación de los niveles de ALE es muy útil para el diagnóstico y monitoreo postoperatorio (7).

### 2.12.3 Tratamiento

La quimioterapia utiliza agentes químicos que se administran con fines paliativos en el CC irreseccable, aunque la probabilidad de mejorar los síntomas y prolongar la existencia es pequeña, no hay tratamiento eficiente para el CC. La mayoría de los fármacos afectan la división celular (9). En el CC se ha empleado el 5-fluorouracilo como coadyuvante en el tratamiento y es el único que produce una respuesta del 20% (10). El tamoxifen es empleado como inhibidor de proteincinasas (3). La radioterapia y la intervención quirúrgica son muy usuales en el CC, la radioterapia es un método eficaz de paliación en la metástasis irrevocable localizada y su fundamento es aliviar el dolor, disminuir el tenesmo y las hemorragias. La extirpación quirúrgica es confiable y se recomienda aún cuando existan metástasis, en la mayoría de los casos resulta y en algunos casos vuelve a surgir el tumor (1,9). Actualmente se están realizando esfuerzos para estimular la actividad inmunológica específica contra CC, empleando antígenos tumorales específicos o tratando a la célula con el fin de generar una respuesta inmune (9). En el tratamiento se ha empleado el uso de INF y 5-fluorouracilo de manera sinérgica para combatir la malignidad en el CC (57).

#### 2.11.4 Oncogenes en la clinica

La identificación de oncogenes alterados en tumores puede aumentar la resolución del diagnóstico, progresión y estrategias para terapia. La presencia de amplificación de oncogenes (myc) están relacionadas con agresividad y diseminación del tumor y por lo tanto corto tiempo de vida, las mutaciones de ras se han asociados con un peor pronóstico (59). En CC las aberraciones de c-Ki-ras están relacionadas con la distinción entre la iniciación y la progresión de la carcinogénesis , existen estudios que se encaminan a correlacionar la presencia de alteraciones en los oncogenes con las características clínicas de los pacientes y determinar si es posible que en enfermedades benignas puedan ser marcadores de malignidad (59).

### III SECCION EXPERIMENTAL

#### 1.- Material

##### 1.1. Reactivos

Reactivos utilizados en la transformación y la amplificación de los plásmidos.

- Medio de cultivo líquido LB.  
10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona c.b.p. 1000 ml pH = 7.5 esterilizado por autoclave.
- Cloruro de Calcio 100mM esterilizado por autoclave.
- Solución amortiguadora TE pH = 8.0  
Tris-Cl 10mM pH = 8.0  
EDTA 1 mM pH = 8.0 se esteriliza por autoclave.
- Solución de ampicilina 12.5 mg/ml.  
se disuelve en amortiguador de fosfatos 600 mM pH = 6.4 y se esteriliza por filtración en Millipore 0.45  $\mu$  se usa a una concentración de 35-50  $\mu$ g/ml.
- Solución de tetraciclina 12.5 mg/ml.  
Se disuelve en etanol absoluto y se prepara en condiciones estériles, se utiliza de 12.5 a 15  $\mu$ g/ml.
- Medio de cultivo en placa LB.  
10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona 5 g de agar c.b.p. 1000 ml pH = 7.5 se esteriliza por autoclave.
- Solución de Cloranfenicol 34 mg/ml.  
se disuelve en etanol absoluto y se esteriliza en Millipore 0.45  $\mu$  y se utiliza a una concentración final de 34  $\mu$ g/ml.

Reactivos empleados en la extracción y purificación de los plásmidos.

- Solución A.  
glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris-Cl 25 mM pH = 8.0 se esteriliza por autoclave y se complementa con 6 mg/ml de Lisozima antes de usarse.

- Solución B.  
NaOH 0.2 N, SDS 1.0% La solución se prepara antes de usarse.
- Solución C.  
60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial, y 28.5 ml de agua destilada la solución es 5 M con respecto al acetato y 3M al potasio.
- Fenol saturado pH > 7.8  
Se licua a 68 ° C se adiciona 8-Hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%, se adiciona un volumen igual de Tris- Cl 0.5 M pH = 8.0. Se agita durante 15 min y se aspira la fase acuosa (superior), se repite la operación dos veces más y se adiciona un volumen igual de Tris-Cl 0.1 M pH = 8.0 se agita durante 15 min y se elimina la fase acuosa. Se repiten las extracciones hasta que el pH del fenol es superior a 7.8 se almacena el fenol con 0.1 volumen de Tris- Cl 0.1 M pH = 8.0 conteniendo 0.2% de β-Mercaptoetanol.
- Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1).
- Solución D.  
Mezcla de volúmenes iguales de fenol saturado y cloroformo -alcohol isoamílico (24:1). Se prepara antes de usarse.
- Solución TES.  
NaCl 0.1 M, Tris-Cl 100 mM pH = 8.0, y EDTA 1 mM pH = 8.0 Se esteriliza por autoclave.
- Ribonucleasa A libre de ADNasa. Concentración final 25 µg/ml.

**Reactivos utilizados en la electroforesis de los plásmidos y los ADNc purificados.**

- Amortiguador TBE 10 X.  
50 g de Trizma base, 27.5 g de ácido bórico, y 20 ml de EDTA 0.5 M pH = 8.0 c.b.p. 500 ml. Se esteriliza por autoclave.
- Bromuro de Etidio 10 mg/ml.
- Gel de agarosa 1% en TBE.  
1 g de agarosa se disuelve en 100 ml de TBE 1X se adiciona bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.

- Solución amortiguadora Loading 6X tipo II.  
0.25 % de azul de bromofenol, 0.25 % de xilencianol y 15% de Ficoll tipo 400. Se prepara en condiciones estériles.

#### Reactivos empleados en la digestión enzimática.

- Solución amortiguadora universal para digestión enzimática.  
Tris acetato 330 mM pH = 7.9, acetato de potasio 660 mM pH = 7.9, acetato de magnesio 100 mM, ASB (albumina sérica bovina) 1 µg/ml, espermidina 30 mM. Se prepara en condiciones estériles.
- Solución amortiguadora pst 10 X.
- Ditiotreititol 10 X.  
solución de DTT 25 mM.
- Enzima de restricción Eco RI.  
Escherichia coli RI 20 000 U/ml se usa 2 U/µg.
- Enzima de restricción Hind III.  
Haemophilus influenzae 10 000 U/ml se usa a 1.5 U/µg.
- Enzima de restricción Pst I.  
Providencia stuarti 10 000 U/ml se usa 1.5 U/µg.

#### Reactivos utilizados en la purificación del ADNc.

- Solución de acrilamida-bizacrilamida 40:1  
se disuelven 40 g de acrilamida y 1 g de bizacrilamida en 100 ml de agua destilada se esteriliza por filtración en Millipore 0.45 µ. Se usan guantes.
- Persulfato de Amonio 10%
- TEMED concentrado
- Solución amortiguadora Loading 5 X.  
0.25 % de azul de bromofenol, 0.25 % de xilencianol, 0.5 % de SDS y 25 % de glicerol se prepara en condiciones de esterilidad.
- Solución de elución.  
Acetato de amonio 500 mM, acetato de magnesio 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1% Se esteriliza por autoclave.

#### Reactivos empleados en la extracción del ARN.

- Solución amortiguadora de homogenización.

Tiocianato de guanidina 4 M

Tris-Cl 0.1 M pH = 7.5

$\beta$ - mercaptoetanol 0.1%

Se disuelven 50 g de tiocianato de guanidina en 10 ml de Tris-Cl 1 M pH = 7.5, c.b.p. 100 ml. Se esteriliza por filtración en Millipore de 0.45  $\mu$  y se complementa con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.14 M.

- Laurilsarcosinato de sodio 10%

- Cloruro de cesio 5.7 M / EDTA 0.01 M pH = 7.5

96 g de CsCl se disuelven en 90 ml de EDTA 0.01 M pH =7.5 Se adiciona DEPC a una concentración final de 0.1 % se mide el volumen se esteriliza por autoclave y se ajusta el volumen.

- Solución amortiguadora TE pH = 7.6

Tris-Cl 10 mM pH = 7.6

EDTA 1 mM pH = 7.6

- Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%

- Acetato de sodio 3M pH = 5.2

40.81 g de acetato de sodio se disuelven en 80 ml de agua destilada se ajusta el pH a 5.2 con ácido acético glacial y se afora a 100 ml. Se esteriliza por autoclave.

- Solución amortiguadora TES pH = 7.6

TE pH= 7.6 y SDS 0.1% Se esteriliza por autoclave.

- Soluciones C y D (ver en reactivos para purificación de plásmidos).

#### Reactivos utilizados en la electroforésis del ARN.

- Solución amortiguadora MOPS 12 X.

MOPS 0.24 M

EDTA 0.012 M

Acetato de sodio 0.06 M.

Se prepara en condiciones estériles.

- Formaldehído 37%

- Gel desnaturalizante de agarosa 1% en MOPS 1 X.

1 g de agarosa se disuelve en 75 ml de agua destilada se

adiciona 8.3 ml de MOPS 12 X, 16.2 ml de formaldehido 37% y bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml.

- Amortiguador con colorantes para análisis electroforético de ARN Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y Ficoll 400 15% se prepara en condiciones estériles.

#### Reactivos empleados en la hibridación del ARN con el ADNc.

- Solución desnaturalizante.

Formamida 50 %

MOPS 1 X

Formaldehido 6 %

- Amortiguador PBS 0.1 M pH = 6.5

La sal mono y disódica de fosfato están 0.1 M y el cloruro de sodio 173 mM esterilizada por autoclave.

- solución mezcla de Iniciadores aleatorios (Random Primers).

HEPES 0.67 M, Tris-Cl 0.17 M, cloruro de magnesio 17 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 33 mM, BSA 1.33 mg/ml. 18 D.O. (260nm) U/ml de iniciadores oligodeoxiribonucleótidos (fracción de hexámeros) pH = 6.8

- Mezcla de nucleótidos.

dATP 0.5 mM, dTTP 0.5 mM, dGTP 0.5 mM, en Tris-Cl 3 mM pH = 7.0 y EDTA 0.2 mM.

- Fragmento Klenow.

fragmento largo de la Polimerasa I : 3 U/ $\mu$ l en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH = 7.0  $\beta$ - mercaptoetanol 10 mM y glicerol 50% (v/v).

- Amortiguador de inactivación del fragmento Klenow.

EDTA sódica 0.2 M pH = 7.5

- Sephadex G-50

10 g de sephadex G-50 se lavan con 160 ml de agua destilada varias veces, para eliminar el dextrán soluble, se equilibra la resina en TE pH = 7.6. Y se esteriliza por autoclave.

- CTP-P<sup>32</sup>

( $\alpha$ -P<sup>32</sup>) dCTP Pb 10205 solución acuosa 370 MBq/ml 10mCi/ml 3000

- Ci/mmol, se usa por cada ADNc marcado 30  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ .
- Formamida 100%
  - EDTA 0.5 M pH = 8.0
  - Solución Deuhardt 50 X.  
5 g de Ficoll tipo 400 , 5 g de polivinilpirrolidina y 5 g de ASB c.b.p. 500 ml. Se prepara en condiciones estériles.
  - Solución amortiguadora de fosfatos 600 mM pH = 6.8
  - ADN de salmón 1 mg/ml.  
Se disuelve en agua estéril se agita durante 2 h a T.A. Se usa a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
  - Solución SSC 20 X.  
Cloruro de sodio 175.3 g  
Citrato de sodio 88.2 g  
Ajustar a pH = 7.0 c.b.p. 1000 ml. Esterilizar por autoclave.

Reactivos de Grado Analítico de Sigma Chemical Company.

- Tetraciclina hidrociorada lote 118 F0050. PM 480.9.  
Cloranfenicol levogiro lote CL-49 potencia 999  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .  
Glicerol PM 92.09.  
DTT DL- Ditiotreitól.  
Cloruro de sodio lote 80H-0094 PM 58.44.  
Tris-Cl Trizma monohidrociorada PM 158.01.  
EDTA sal sódica de etilendiaminotetracético PM 372.9.  
Ampicilina anhidra lote 50HO-686 PM 349.4.  
Azul de bromofenol sal sódica lote B-6131.  
Xilencianol lote X-2751 PM 538.6.  
Trizma base PM 121.1.  
Acido bórico anhidro PM 61.83.  
Bromuro de etidio anhidro lote E-8751 PM 394.3.  
Tiocianato de guanidina PM 118.2.  
N-Laurilsarcosinato de sodio PM 293.4.  
Dietilpirocarbonato PM 162.1.  
Acetato de sodio trihidratado PM 136.08.  
MOPS (3-(N-Morphelino)propanesulfonic ácido) sódico PM 231.3.

Formaldehido solución 37% PM 30.03.

Formamida 100%

Citrato trisódico dihidratado lote C-8532 PM 294.1.

Fosfato sódico monobásico monohidratado PM 137.99.

Fosfato sódico dibásico heptahidratado PM 268.07.

Glucosa: sucrosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil)- $\beta$ -D - Fructuosa PM 342.3.

Lizosima (muramidasa; EC 3.2.1.17) lote L-6876.

Dodecilsulfato de sodio PM 288.4.

Acetato de potasio PM 98.65.

Ribonucleasa A de pancreas bovino Tipo I-A.

#### Reactivos de Gibco BRL

Extracto de levadura cat. M00393C.

peptona cat. M00392C.

Agar cat. M00391C.

Agarosa ultrapura Lote BQ-5201.

Bis-acrilamida ultrapura PM 154.17.

Cloruro de cesio Ultrapuro.

Sistema de marcado de ADNc por iniciador aleatorio (random primers) Cat. 8187SA lote ANX001.

Escherichia coli DH5 $\alpha$ . libreria eficiente de c lulas.

Bolsas de Hibridación cat. 8278BA.

#### Reactivos de Promega

EcoRI concentración 20 000 U/ml. Lote R128A.

Hind III concentración 10 000 U/ml. Lote R446.

Pst I concentración 10 000 U/ml. Lote R134.

Amortiguador Pst I 10 X lote 286.

#### Reactivos de Pharmacia LKB

Ficoll tipo 400.

Sephadex G-50 cod. 17-0042-01.

**Reactivos de Bio-Rad Laboratorios**

TEMED N,N,N,N-tetrametilendiamina PM 116.21.

Acrilamida PM 71.08.

$\beta$ -mercaptoetanol PM 78.13.

**Reactivo de Amersham International**

( $\alpha$ -P<sup>32</sup>) dCTP PB 10205 10 mCi/ml.

**Reactivos de Baker Analyzed Reactivos**

Alcohol etílico absoluto PM 46.06.

Cloruro de calcio PM 110.996.

Hidroxido de sodio PM 39.999.

**Reactivos de Merck**

8-hidroxiquinoleína PM 145.15.

Acido acético glacial PM 60.06 ll.= 1.05 Kg 100%

**1.2. Material y equipo de laboratorio**

- Jeringas Hamilton modelo 710-N capacidad 100  $\mu$ l. Sigma Chemical Company.
- Maquina reveladora de placas de rayos X Kodak RPX-OMAT processor, Modelo M6B.
- Selladora de bolsas de hibridación.
- Placa de exposición : Film Kodak X-OMAT XAR-5.
- Cassette de exposición con pantalla intensificadora. Sigma Chemical Company.
- Tubos de microfuga de polipropileno 1.5 y 0.5 ml Brinkmann.
- Puntas para pipetas automáticas tipo Oxford 911 T.
- Baño de agua para tubos de microfuga : Multi-Block Heater Lab-Line.
- Espectrofotómetro GBC UV-visible 911.
- Celdas de cuarzo para espectrofotometro volumen minimo 100  $\mu$ l Sigma Chemical Company.
- Centrifuga Beckman modelo J-21 con rotores JA-20 y JA-10.
- Baño de agua : Shaking Water Bath 25 Precision.

- Microfuga : Eppendorff centrifuge 5415.
- Pipetas automáticas Gilson Medical Electronics capacidad de 20, 100, 200 y 1000  $\mu$ l.
- C maras de electroforésis GNA-100 y GNA-200 Pharmacia.
- Fuente poder EPS 500/400 Pharmacia.
- Transiluminador UVP, inc.
- Cámara fotográfica : Fotodyne Incorporated Bio/can Scientific 11 2170 Dunwin Prive.
- Película fotográfica. Polaroid 667 blanco y negro instantanea sin recubrimiento, 150 3000/36°C.
- Centrifuga Sorvall RT6000B Refrigerated . Dupont con rotor RT6000B máximo 3500 rpm.
- Centrifuga concentradora : Speed Vac Concentrator Savant Refrigerated condensation trap y bomba de vacio Lammert.
- Ultracongelador -80°C Revco.
- Homogenizador Brinkman Instruments Co.
- Balanza analítica Sartorius capacidad 0-500 g.
- Balanza Metter PL 1200 capacidad 0-1000 g.
- Ultracentrifuga Beckman LS-50B con rotor SW 50.1.
- Bomba peristáltica Rabbit.

### 1.3. Material Biológico

#### Biopsias de pacientes.

Para la realización de este trabajo se colectarán biopsias quirúrgicas congeladas inmediatamente después de ser removidas del paciente, en nitrógeno líquido, esto es muy importante para que el ARN no se hidrolize y evitar así se afecte el análisis. El material biológico fue obtenido del Instituto Nacional de la Nutrición, Instituto Nacional de Cancerología, Hospital de Oncología IMSS, y Hospital General, se recolectó tanto biopsias de tejido tumoral como tejido normal adyacente.

#### Características de los genes en los plásmidos.

El oncogen c-fos fue insertado en el plásmido pSp65, el

tamaño del inserto es de 3.5 Kb y el plásmido 3 Kb. Es resistente a ampicilina.

El oncogen c-Ki-ras fue insertado en el plásmido p640, el tamaño es 0.615 Kd, Eco- Hind PBR322. Es resistente a ampicilina.

El oncogen c-myc fue insertado en PR y C 7.4, el tamaño es 4.3 Kd de PBR322 y 1.029 Kd del fragmento. Es resistente a tetraciclina (104).

El fragmento de AFP fue insertado en PBR322. El tamaño del gene es de 0.650 Kd y es resistente a tetraciclina.

## 2.- Métodos

### 2.1 Transformación de E. coli DH5 $\alpha$ con el plásmido (105).

2.1.1 En medio líquido LB ( 5 ml ), se inocula una colonia pura y aislada de E. coli DH5 $\alpha$ . Se incuba durante 12 h a 50 rpm y 37°C.

2.1.2 Se toma 1 ml de este cultivo y se coloca en 100 ml de LB. Se incuba a 37°C hasta alcanzar una D.O. (650nm) = 0.2-0.4 .

2.1.3 Para cada reacción de transformación se utilizan 5 ml de este cultivo, los cuales se colocan en tubos Corex de 15 ml. en hielo 10 min y se centrifugan 5 min a 6500 rpm a 4°C.

2.1.4 Se decantan los sobrenadantes y se resuspenden en medio volumen de cloruro de calcio 100 mM frío. Se colocan en hielo durante 30 min .

2.1.5 Las suspensiones anteriores se centrifugan durante 5 min a 6500 rpm y 4°C. Las pastillas se resuspenden en 200  $\mu$ l de cloruro de calcio 100mM frío. Las suspensiones se transfieren a tubos de microfuga y se incuban a 4°C 12-24 h.

2.1.6 A las células bacterianas sensibilizadas se les adiciona 0.1  $\mu$ g de plásmido y se colocan en hielo 30 min, Se incuban en un baño de agua a 42°C durante 2 min y se regresan al hielo. Se

transfieren a tubos con 2 ml de LB y se incuban a 37°C durante 90 min .

2.1.7 Se realizan sembrados a diferentes diluciones en placa de medio LB conteniendo el antibiótico al que el plásmido es resistente y se incuban a 37°C. Se toman colonias aisladas y se resiembran en las mismas condiciones.

2.1.8 Para el almacenamiento de las células transformadas se realiza un cultivo confluyente de 24 h en LB en placa con el antibiótico correspondiente, se resuspenden todas las colonias en 1 ml de medio líquido LB y se impregnan en papel filtro Whatman 3 MM estéril, se sellan las bolsas y se congelan a -70°C.

## 2.2 Amplificación de los plásmidos (105).

2.2.1 Colonias aisladas de los plásmidos se inoculan en 10 ml de medio líquido LB, en las siguientes condiciones:

Plásmido	µg/ml de antibiótico
c-fos	35-50 de ampicilina
c-Ki-ras	35-50 de ampicilina
c-myc	12.5-15 de tetraciclina
AFP	12.5-15 de tetraciclina

Se incuban a 37°C 300 rpm durante 12 h .

2.2.2 Cada cultivo se transfiere a un matraz con 125 ml de medio líquido LB con su antibiótico correspondiente y se incuban en las mismas condiciones. Hasta una D.O.(600nm) = 0.6. Cada cultivo se transfiere a matraces con 250 ml de medio líquido LB con su antibiótico correspondiente y se incuban durante 3 h a 150 rpm y 37°C. Se adicionan 34 µg/ml de cloranfenicol y se incuban en las mismas condiciones durante 12 h.

## 2.3 Extracción y purificación de plásmido (105).

2.3.1 Los cultivos de 250 ml se colocan en hielo 10 min, se

transfieren a tubos Beckman de 400 ml y se centrifugan a 4000 rpm 15 min a 4 °C. Se decantan y las pastillas se resuspenden en 30 ml de solución TES, se centrifugan en las mismas condiciones.

2.3.2 Se decantan los sobrenadantes y las pastillas se resuspenden en 5 ml de solución A. Se incuban 10 min a T.A. se adicionan 10 ml de solución B, se mezcla cuidadosamente y se colocan en hielo 5 min y se agregan 7.5 ml de solución C fría. Se centrifugan a 18000 rpm 25 min a 4°C dos veces, los sobrenadantes se transfieren a tubos Corex de 150 ml y se extraen con un volumen de solución D. Se centrifugan a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se extraen con un volumen de cloroformo-isoamílico y se centrifugan a 6000 rpm 5 min a 4°C .

2.3.3 Los sobrenadantes se precipitan con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a T.A. durante 2 h, se centrifugan a 12000 rpm durante 30 min a 10°C. Se lavan las pastillas con 5 ml de etanol 80%, se centrifugan en las mismas condiciones y las pastillas se resuspenden en 5 ml de TE pH = 8.0 y 500 µl de Acetato de sodio 3M pH = 5.2. Se precipitan con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se guardan a -20°C durante 12 h.

2.3.4 Se Centrifugan a 10000 rpm 30 min a 4°C y las pastillas se resuspenden en 1 ml de TE pH = 8.0. Se transfiere a un tubo de microfuga y se adicionan a cada tubo 25 µg/ml de Ribonucleasa A, se incuban 12 h a 4°C. Los plásmidos purificados se guardan a -20°C.

2.3.5 Se realizan diluciones 1:100 y se leen en el espectrofotómetro en las longitudes de onda de 260, 280 y 310 nm. La pureza se determina calculando la relación 260/280, la cual deber ser cercana a 2.0 y el rendimiento se calcula de la siguiente manera:

1 unidad de D.O.= 50 µg/ml de ADN. Por lo tanto :

(D.O.260nm) (1:100) (50) = µg/ml de ADN

2.3.6 Para la determinación de integridad del plásmido purificado se coloca en tubos de microfuga independientes, 3 µg de plásmido se le adiciona 1 µl de amortiguador Loading 6 X y se colocan en los carriles de un gel de agarosa 1% en TBE, se migran a 80 V, con amortiguador electrolito TBE 1 X. Las bandas de los plásmidos se observan con luz UV en un espectofotómetro y se fotografía el gel.

#### 2.4 Digestión Enzimática (105).

2.4.1 En tubos para microfuga se colocan :

Plásmido con c-fos.

20 µg de plásmido purificado con c-fos integrado  
4 µl de amortiguador universal para digestión enzimática  
4 µl de DTT 10X  
2 µl de Eco RI (40 unidades)  
3 µl de Hind III (30 unidades)  
2 µl de agua estéril

Plásmido con c-Ki-ras.

20 µg del plásmido purificado con c-Ki-ras integrado  
4 µl de amortiguador universal para digestión enzimática  
4 µl de DTT 10X  
2 µl de Eco RI (40 unidades)  
3 µl de Hind III (30 unidades)  
2 µl de agua estéril

Plásmido con AFP.

30 µg de plásmido purificado con AFP integrado  
4 µl de amortiguador Pst 10X  
3.5 µl de Pst I (30.5 unidades)  
2.5 µl de agua estéril

Plásmido con c-myc.

30 µg de plásmido purificado con c-myc integrado

4  $\mu$ l de amortiguador Pst 10 X  
3.5  $\mu$ l de Pst I (30.5 unidades)  
2.5  $\mu$ l de agua estéril

Plásmido con Histona.  
20  $\mu$ g de plásmido purificado con histona integrada  
2.5  $\mu$ l de amortiguador III de BRL  
2.0  $\mu$ l de Eco RI (40 unidades)  
1.0  $\mu$ l de agua estéril

Se incuban en baño de agua a 37°C durante 12 h.

#### 2.5 Purificación del ADNc (105)

2.5.1 Se prepara el gel de acrilamida 6%

Acrilamida-bizacrilamida 40:1	3.75 ml
TBE 10X	2.50 ml
Persulfato de amonio 10%	0.30 ml
Agua estéril	18.75 ml
TEMED	7 $\mu$ l

2.5.2 Se realiza una precorrida de 1 h en amortiguador electrolito TBE 1X. Las muestras se preparan con 10  $\mu$ l de amortiguador Loading 5X por cada 30  $\mu$ l de plásmido digerido. Las muestras se colocan en los carriles utilizando una jeringa Hamilton y se realiza la migración a 100 V.

2.5.3 El gel se tiñe con Bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/ml en TBE 1X se observa y se fotografía.

2.5.4 En un transiluminador con UV se localizan las bandas de los fragmentos de los oncogenes, se cortan las bandas de interés y se colocan en la columna de elución.

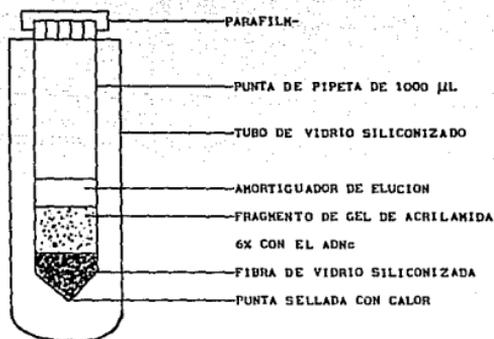


FIGURA 1. COLUMNA DE ELUCION PARA PURIFICACION DE LOS ADnc DE LOS GENES EN ESTUDIO.

2.5.5 Los fragmentos de los oncogenes colocados en la columna de elución, se homogenizan utilizando un agitador de vidrio siliconizado. Se adicionan 600 µl de solución de elución a cada columna, se incuban a 37°C durante 12 h. Se cortan las puntas de las columnas de elución y se centrifugan a 2000 rpm 10 min a 4°C. Se adiciona 200 µl de solución de elución a cada columna y se centrifugan. Los sobrenadantes se transfieren a tubos de microfuga y se concentran en una microfuga con vacío (Speed-Vac), el volumen a 400 µl se precipitan con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a 4°C durante 12 h. Se centrifugan a 10000 rpm 4°C durante 10 min. Las pastillas se lavan con etanol al 80% y se resuspenden en 15 µl de TE pH = 8.0 se guardan a -20°C.

2.5.6 A los ADnc purificados se les realizan pruebas de pureza, rendimiento e integridad, de la misma manera que a plásmidos purificados.

## 2.6 Extracción de ARN (105).

2.6.1 Se pesan 1 g de tejido tanto normal como tumoral y se

homogenizan independientemente con 5 ml de amortiguador de homogenización. Se adiciona laurilsarcosinato de sodio a una concentración final de 0.5% ; Este homogenado se pasa a través de una aguja número 18 hasta eliminar la viscosidad. Se agrega un volumen igual de solución D, se agitan y se dejan en hielo 10 min. Se centrifugan a 10000 rpm 4°C durante 10 min.

2.6.2 Se recuperan las fases acuosas y se precipitan con etanol absoluto frío, se guardan a -20°C durante 2 h. Se Centrifugan a 10000 rpm 4°C durante 30 min. Se Resuspenden las pastillas en 1 ml de amortiguador de homogenización con laurilsarcosinato de sodio 0.5%

2.6.3 Por medio de una jeringa con aguja número 23, se coloca esta suspensión en el tubo de ultracentrifuga al cual previamente se le agrego 3.1 ml de Cloruro de cesio 5.7 M /EDTA 0.01 M pH = 7.5 se centrifugan en el rotor SW 50.1 a 40000 rpm 20°C 24 h.

2.6.4 Se decantan los sobrenadantes y las pastillas se lavan con etanol 70% (sin homogenizar) esto se realiza con la finalidad de eliminar el CsCl en exceso. Se decanta el etanol y las pastillas se dejan secar a T.A. Se resuspenden en 325 µl de TES pH = 7.6 y se adicionan 150 µl de TE pH =7.6 y 40 µl de acetato de sodio 3M pH = 5.2, se precipitan con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20 °C durante 2 h. Se Centrifugan a 12000 rpm 4°C durante 30 min. Se Lavan las pastillas con etanol 80% y se secan a T.A. Se Redisuelven en 50 µl de agua estéril tratada con DEPC y se guardan a -70°C.

2.6.5 Se realizan diluciones 1:100 y se leen a 260, 280 y 310 nm. La pureza se determina por el cálculo de la relación 260/280 la cual debe ser cercana a 2.0 y el rendimiento se calcula de la teniendo en cuenta que 1 unidad de D.O. = 40 µg de ARN  
(D.O.260nm) (1:100) (40) = µg/ml de ARN

## 2.7 Transferencia del ARN a filtros "Gene-Screen" (105).

2.7.1 La electroforésis del ARN se lleva a cabo en un gel de agarosa 1% desnaturalizante en MOPS 1X. Para la preparación de las muestras se colocan en un tubo de microfuga 10 µg de ARN, 23 µl de solución desnaturalizante y se colocan en baño de agua a 60°C durante 5 min. Se colocan en hielo 5 min y se agrega 3 µl de amortiguador con colorantes (azul de bromofenol y xilencianol) para ARN. Se colocan en los carriles y se migra a 70 V en presencia de amortiguador electrolito MOPS 1X, durante 3 h. Se observan las bandas de los ARN ribosomales 28s y 18s con la ayuda del transiluminador con luz UV y se fotografía el gel.

2.7.2 El gel se coloca en agua estéril tratada con DEPC 10 min. Después se coloca en PBS 0.05M pH = 6.5 al igual que el papel filtro Whatman 3MM y el filtro "Gene-Screen" del tamaño exacto del gel y se coloca como muestra el dibujo de la figura 2.

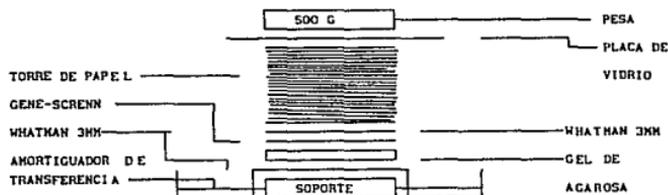


FIGURA 2. TRANSFERENCIA DE LOS ARN DEL GEL A FILTROS "GENE-SCREEN"  
(NORTHERN BLOT).

2.7.3 La transferencia se realiza durante 18-24 h a T.A. Una vez transcurrido este tiempo el "Gene-Screen" se coloca en 200 ml de

PBS 0.05M pH=6.5 y se seca a T.A. Los filtros "Gene-Screen" se colocan en papel filtro Whatman 3MM y se hornean al vacío a 80°C durante 2 h. Estos filtros "Gene-Screen" es opcional que sea al vacío pero los filtros de nitrocelulosa es indispensable que se horneen al vacío de los contrario pueden explotar.

## 2.8 Marcado de ADNc con CTP-P32

Iniciadores aleatorios ("Randow-Primers").

2.8.1 25 ng de ADNc purificado contenidos en un volumen total de 20  $\mu$ l de TE pH=8.0, se desnaturalizan en baño de agua hirviendo durante 5 min y se colocan en hielo durante 5 min. Se agregan 6  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos, 15  $\mu$ l de amortiguador con mezcla de iniciadores aleatorios (Randow-Primers), 3.5  $\mu$ l de CTP-P<sup>32</sup> (3  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de fragmento Klenow. Se mezclan cuidadosamente y se incuban a temperatura ambiente durante 3 h, protegiendo de las radiaciones en contenedores de plomo. Terminada la incubación se adiciona 5  $\mu$ l de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow y 150  $\mu$ l de TE pH=8.0 se pasa a través de una columna de Sephadex G-50, se centrifugan las columnas a 1500 rpm 4°C durante 5 min. Con la ayuda de un contador de radiactividad Geiger se toma la lectura en la columna y en el tubo de microfuga de recolección del ADNc marcado radiactivamente y se determina el porcentaje de la eficiencia de incorporación de radiactividad con la siguiente fórmula :

(Lectura del tubo/lectura de la columna)(100)

Donde una eficiencia de marcado superiores al 60% son aceptables.

## 2.9 Hibridación del ARN con ADNc marcado. "Northern Blot" (105).

2.9.1 Se miden las áreas de los filtros "Gene-Screen" y se multiplican por 0.2 y esos son los ml de amortiguador de prehibridación que se necesitan. El amortiguador de prehibridación

contiene lo siguiente:

Formamida	50.0%
SDS	0.2%
EDTA	10mM
Deuhardt	4X
SSC 20X	2X
Amortiguador de fosfatos pH=6.8	120mM
ADN salmón	10.0%

2.9.2 Los filtros "Gene-Screen" se colocan en bolsas de hibridación con los ml de amortiguador de prehibridación necesarios. Se sellan perfectamente y se colocan en un baño de agua a 42°C a 40 rpm durante 24 h. Se elimina la mitad del volumen y se agrega el ADNc marcado con CTP-P<sup>32</sup> y desnaturalizado en agua hirviendo durante 5 min, se usa un filtro "Gene-Screen" para cada ADNc marcado. Se sellan nuevamente las bolsas, cuidando que no se formen burbujas, se colocan en un recipiente de acrílico en un baño de agua a 42°C durante 24 h.

2.9.3 Los filtros "Gene-Screen" se sacan de las bolsas de hibridación y se lavan en 200 ml de SSC 2X agitando durante 15 min, este procedimiento se repite, después se colocan en 500 ml de SSC 0.1X y SDS 0.1% a 50 C con agitación a 50 rpm este proceso se efectua dos veces, se dejan secar un poco los filtros "Gene-Screen", de manera que queden húmedos, se introducen en bolsas de plástico y se sellan. Se colocan en los cassettes de exposición con pantalla intensificadora con placa de exposición Kodak X-OMAT XAR-5. Se guardan a -70°C el tiempo necesario y se revelan en una máquina reveladora de placas Kodak RPX-OMAT. Otra manera de revelar las placas es manualmente, utilizando la solución fijadora y reveladora.

## IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Purificación del ADNc de los oncogenes.

#### 4.1.1 Transformación de los plásmidos.

Los plásmidos se introdujeron en E.coli DH 5 $\alpha$ , la transformación fue comprobada al adquirir la bacteria la resistencia a los antibióticos que están insertados junto a los oncogenes en los plásmidos.

Al realizar los cultivos de las diferentes diluciones se demostró que la eficiencia de la transformación fue aceptable, ya que en diluciones de  $10^{-6}$  se observó un crecimiento considerable de las bacterias transformadas.

#### 4.1.2 Amplificación, purificación y digestión enzimática de plásmidos.

Una vez que se llevó a cabo la transformación de los plásmidos (AFP y c-myc insertados en forma independiente en plásmidos pBr322, el oncogen c-fos insertado en el plásmido pSp65 y el oncogen c-Ki-ras insertado en el plásmido p640), se amplificaron y se purificaron por la metodología antes mencionada. La Figura 1 muestra la electroforesis de los plásmidos purificados. El primer carril corresponde a  $\lambda$  digerida con Hind III, con bandas correspondientes de arriba hacia abajo a los siguientes fragmentos: 23.13 Kd, 9.416 Kd, 6.557 Kd, 4.361 Kd, 2.322 Kd, 2.057 Kd y 0.564 Kd, los cuales se utilizaron para la localización de los plásmidos. Los carriles marcados con letras mayúsculas corresponden a los plásmidos purificados, ellos presentan diversas bandas debido a las diferentes formas en la estructura de los plásmidos, y no se observa la presencia de ARN

contaminante (fig 1).

Los carriles marcados con las letras minúsculas pertenecen a los plásmidos digeridos (fig 1). Las bandas de mayor peso molecular corresponden a los plásmidos y las de menor peso molecular a los fragmentos de los genes que se emplearán en este estudio.

TAMANO DE  $\lambda$

23.23 Kd  
9.41 Kd  
6.55 Kd  
4.36 Kd  
2.32 Kd  
2.05 Kd  
0.56 Kd

$\lambda$  A F H M a f R h m r



FIGURA 1 ELECTROFORESIS DE LOS PLASHIDOS PURIFICADOS A (AFP), F (C-FOS), H (HISTONA), M (C-MYC) Y R (C-KI-RAS). LOS PLASHIDOS DIGERIDOS SON a (AFP), f (C-FOS), h (HISTONA); m (C-MYC) Y r (C-KI-RAS).

#### 4.1.3 purificación del ADNc de cada gen en estudio.

Los ADNc de cada gene en estudio fueron eluidos del gel de poliacrilamida, recuperandose con una precipitación etanólica. Se resuspendieron en agua estéril y se tomaron muestras de cada uno de ellos deteminandose su pureza e integridad. La pureza osciló entre 1.8 a 1.93 (el rango teórico aceptable es de 1.8 a 2.0), La integridad se demostró en una electroforésis de agarosa al 1%. Los resultados se muestran en la figura 2 , donde se puede apreciar

que no existe material de degradación. La banda del ADNc de c-Ki-ras es muy tenue debido a que se encuentra a bajas concentraciones en comparación con los otros ADNc. En la tabla 1 se muestra el tamaño de los genes utilizados para este estudio y se observa que son similares a los reportados en la literatura.

TABLA 1 . TAMAÑO DE LOS ADNc DE LOS ONCOGENES c-fos, c-myc y c-Ki-ras y el ADNc de AFP.	
GENE	TAMAÑO (Kd)
AFP	0.650
c-fos	3.026
c-myc	1.029
c-Ki-ras	0.615



FIGURA 2. ELECTROFORESIS DE LOS ADNc DE LOS GENES PURIFICADOS. EN EL CARRIL 1 SE OBSERVA  $\lambda$ , A (AFP), F (C-FOS), M (C-MYC) Y R (C-KI-RAS).

#### 4.2 Extracción y purificación del ARN de las biopsias tisulares.

##### 4.2.1 Características de los tejidos tumorales estudiados.

Los tejidos de una población de nueve pacientes fueron

recolectados en los diferentes hospitales, y sus características se muestran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2 GENERALIDADES DE LOS PACIENTES			
PACIENTE	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO
I	m	35a	Carcinoma Rectal
II	m	33a	Carcinoma de Colon
III	f	38a	Adenocarcinoma Rectal
IV	m	40a	Adenoma Rectal Velloso
V	m	19a	Adenocarcinoma de Colon
VI	f	30a	Síndrome de Crohn (polipo)
VII	f	41a	Carcinoma de Colon
VIII	m	38a	Adenocarcinoma de Colon
IX	f	67a	Carcinoma de Colon

a = años

m = masculino

f = femenino

TABLA 3 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS TUMORES			
PACIENTE	MALIGNIDAD	METASTASIS	GRADO DE DIFERENCIACION
I	II	serosa	bien diferenciado
II	IV	hepática	moderado y mucoproduccion
III	III	ganglios	moderado
IV*	-	-	-
V	III	ganglios	moderado
VI*	-	-	-
VII	I	-	bien
VIII	III	ganglios	bien
IX	I	-	bien

\* pacientes con tumores benignos colorectales.

Al paciente número I le corresponden las muestras (1 y 2), paciente II (3 y 4), al paciente III (5 y 6), al paciente IV (7 y 8), al paciente V (9 y 10), al paciente VI (11 y 12), al paciente VII (13 y 14), al paciente VIII (15 y 16), y al paciente IX (17 y 18), donde las muestras con números nones corresponden al tejido normal adyacente y los números pares a las muestras del tejido tumoral.

#### 4.2.2 Integridad del ARN

Los ARNs de tejidos tumorales y normales fueron extraídos por diferentes técnicas de extracción. Una de ellas fue la que utiliza guanidina-fenol (Maniatis et al 1982), la cual al llevarse a cabo el rendimiento de ARN fue muy bajo. Otra técnica empleada fue la que usa LiCl 4 M (Cathala et al 1987), al efectuarse esta metodología no se aisló ARN de las biopsias, esto debido a que el ARN se degradó, algunos tipos de tejidos necesitan más volúmenes de LiCl 4 M, por ejemplo el hígado necesita 20 volúmenes (comunicación personal R. Sagal) y la técnica original solo indica 7 volúmenes. La metodología de extracción de ARN utilizando el gradiente de cloruro de cesio fue la más indicada, en este caso, ya que se obtuvieron buenos rendimientos, mayor pureza e integridad excelente. Este tejido es muy rico en ribonucleasas, polisacáridos y grasas, así que realizando una extracción fenol-cloroformo-isoamílico se eliminó gran parte de las proteínas e inhibió las nucleasas, posteriormente el gradiente de CsCl permitió purificar el ARN.

En la Figura 3 se observa la fotografía de la electroforesis de los ARNs purificados, en donde se muestra que se encuentran integros. Las subunidades del ARN ribosomal 28s y 18s están en condiciones aceptables y no se observó material de degradación.

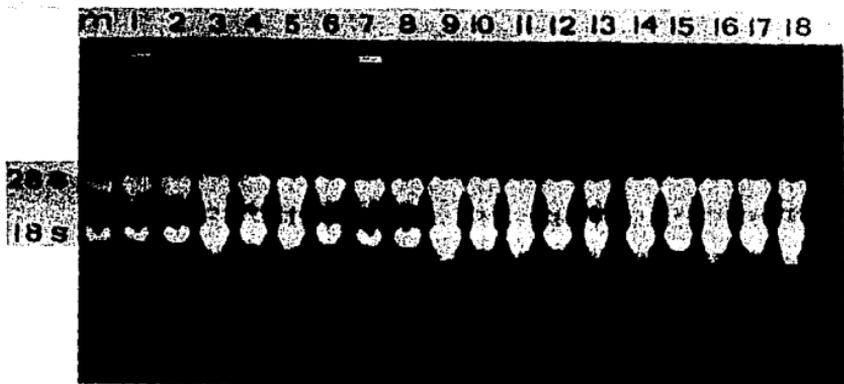


FIGURA 3. ELECTROFESIS DE ARN. LOS NUMEROS NONES CORRESPONDEN A MUESTRAS NORMALES Y LOS PARES CORRESPONDEN A LOS TUMORALES.

#### 4.2.3 Pureza y rendimiento de los ARN

El criterio de pureza que se siguió fue la determinación de la absorbancia a 260, 280 nm, cuyo coeficiente debe ser cercano a 2.0. El rango que se consideró aceptable fue de 1.80 a 2.0. También se determinó la absorbancia a 310 nm, la cual nos

permitió demostrar la ausencia de carbohidratos. En la tabla 4 se muestran los resultados de la relación 260/280 de los ARNs de los tejidos. La mayoría de los ARNs mostrarán un coeficiente el cual está dentro del rango establecido, con excepción de las muestras 7 y 15, sin embargo presentarán patrones electroforéticos que son adecuados en cuanto a tamaño e integridad.

El rendimiento de los ARNs se determinó tomando en cuenta que 1 Densidad Óptica es igual a 40  $\mu\text{g}$  de ARN.

TABLA 4 PUREZA Y RENDIMIENTO DE LOS ARN					
MUESTRAS	260nm	280nm	310nm	260/280	$\mu\text{g/g}^*$
1	0.764	0.393	0.003	1.94	764
2	0.650	0.326	0.000	1.99	650
3	0.592	0.292	0.000	2.00	590
4	0.303	0.145	0.001	2.08	300
5	0.765	0.395	0.004	1.96	760
6	0.804	0.424	0.007	1.89	640
7	0.379	0.171	0.008	2.20	300
8	0.699	0.366	0.006	1.82	700
9	0.507	0.255	0.009	1.98	500
10	0.138	0.028	0.007	2.10	138
11	0.984	0.524	0.005	1.87	780
12	0.277	0.112	0.009	2.10	220
13	0.288	0.120	0.000	2.10	230
14	0.336	0.142	0.001	2.10	260
15	0.961	0.603	0.000	1.60	190
16	0.769	0.406	0.009	1.89	770
17	0.208	0.100	0.001	2.08	200
18	0.428	0.208	0.000	2.00	340

\*  $\mu\text{g}$  de ARN por gramo de tejido.

En la última columna de la tabla 4 se observa el rendimiento de las muestras y en la cual se puede apreciar que la

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

concentración del ARN es adecuado, con excepción de las muestras 10 y 15 cuyo rendimiento fue menor, esto debido probablemente a que estas muestras contenían gran cantidad de grasa.

Es necesario hacer hincapié en que estos ARNs fueron extraídos de biopsias que fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de ser removidas del paciente, esto es de gran importancia ya que anteriormente la recolección de tumores se efectuaba en hielo seco y tiempo después haberse practicado la cirugía, los ARNs extraídos de estas muestras en su mayoría se encontraban degradados.

#### 4.3 Hibridación de los ARN con el ADnc de cada gen.

##### 4.3.1 Hibridación de los ARN con Histona.

Con el objeto de tener un control en relación a la cantidad de ARN depositado en cada carril, e hibridar con las sondas cantidades similares de material nucleico de los tumores y que realmente fueran comparables, se llevó a cabo un control de expresión interno. De esta manera se asegura que las cantidades de ARN depositado en cada carril de la electroforesis sean semejantes (10 µg). Este control se llevó a cabo utilizando al gene de histona, el cual es un gene muy conservado a través de la evolución y en raras ocasiones se encuentra alterado.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la autoradiografía de esta hibridación, en donde se observa que la mayoría de los ARN de las muestras presentan una expresión semejante lo que indica cantidades aproximadamente iguales, a excepción de las muestras 2, 6, 12, 14 y 18. En estas muestras la expresión de histona es ligeramente menor, producto de la manipulación experimental.

La expresión del ADnc de histona se localizó abajo de la subunidad 18s en la separación electroforética.

28s

18s

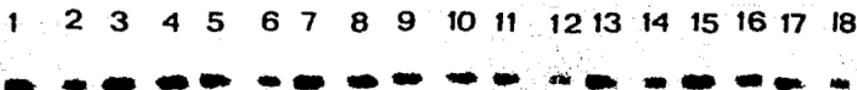


FIGURA 4. AUTORADIOGRAFIA DE LA HIBRIDACION DE LOS ARN CON EL ADnc DE HISTONA.

#### 4.3.2 Hibridación de los ARN con el ADnc de AFP.

En la Figura 5 se observa la expresión del gene de AFP con las diferentes muestras de ARN. En el paciente I (1 y 2) no hubo expresión de este gene ni en la muestra normal ni en la tumoral, el paciente II (3 y 4) muestra una expresión similiar en ambas muestras, pero muy sobreexpresado comparado con el paciente I, el tumor del paciente II presentaba un estado avanzado de la enfermedad. El III muestras (5 y 6), presenta una expresión de 4 veces más en el tejido tumoral que en el normal. En el paciente IV (7 y 8) se observa una sobreexpresión de 6.1 veces sobre el tejido normal. El paciente V (9 y 10) mostró una expresión semejante en ambas muestras. Los pacientes VI (11 y 12), VII (13 y 14) y VIII (15 y 16) presentarán una sobreexpresión de 2.5 veces sobre sus normales respectivos. Por último el paciente IX (17 y 18) no mostró cambios significativos en la expresión de sus muestras.

Si se comparan los dos tumores de recto el I y el III (diferenciado y moderadamente diferenciado), en el primero no hubo expresión de AFP mientras que en el segundo se observó una sobreexpresión de 4 veces sobre el normal, podría ser que estas diferencias sean debidas al grado de diferenciación celular entre

estos dos tumores, sin embargo los pacientes VII y VIII, aunque son de tumores de colon, también presentaron sobreexpresión de AFP en los tumores y corresponden a tumores bien diferenciados. Los tumores de los pacientes II y V expresan cantidades similares tanto en su control como el tumor y pertenecían a los moderadamente diferenciados. El tumor IX era un adenocarcinoma moderadamente diferenciado y no presentó diferencias. Así de acuerdo a los resultados no parece haber una correlación de la expresión de AFP y el grado de diferenciación celular, con excepción de los dos carcinomas rectales ( el moderadamente diferenciado mostró un incremento en la expresión, mientras que en el bien diferenciado no se observó aumento alguno de la expresión).

28s

18s

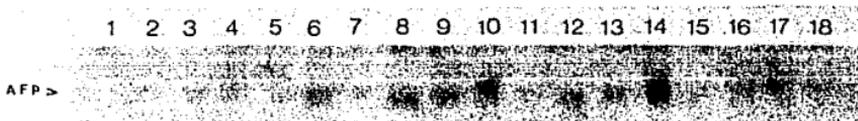


FIGURA 5. AUTORADIOGRAFIA DE LA HIBRIDACION DE LOS ARN CON EL ADNc DE AFP CUYO TAMANO ES DE 0.650 Kd.

Cabe señalar que el tiempo de exposición de los filtros "Gene-Screen" donde se llevó a cabo la hibridación con este gene, en presencia de la placa Kodak, fue de dos semanas. Este tiempo de exposición fue mayor que el empleado en los oncogenes, los cuales tuvieron un tiempo de exposición de 2 h.

Se ha reportado en la literatura un caso de una mujer en

estado de gestación que padecía CC, donde se encontró que los niveles de AFP en suero fueron más altos que los normales (99). También se ha publicado que existe sobreexpresión de AFP en tumores gastrointestinales entre otros (96). En líneas celulares de colon como Caco-2 se han encontrado altos niveles de AFP (100). En el presente estudio, aunque la población analizada es pequeña los resultados muestran que la expresión de AFP está incrementada en 5/9 el cual corresponde al 55% de los tumores analizados.

#### 4.3.3 Hibridación de los ARN con el ADnc de c-Ki-ras

La figura 6 muestra los resultados de la hibridación de los ARNs con este oncogen. Los pacientes II (3 y 4), V (9 y 10) y VII (13 y 14) presentaron expresiones similares en la muestra tumoral y normal. Los pacientes II (3 y 4) y VI (11 y 12) mostraron una sobreexpresión de 3.7 veces sobre sus normales respectivos. En los pacientes III (5 y 6), IV (7 y 8), VIII (15 y 16) y IX (17 y 18) se observa una sobreexpresión de las muestras normales comparados con las tumorales. Estos resultados podrían explicarse tal vez por una represión de la expresión del gene, aunque la mutación más frecuentemente encontrada en el oncogen c-Ki-ras es una mutación puntual en el segundo nucleótido del codón 12, no lo excluye de sufrir otro tipo de alteraciones como puede ser una represión de su expresión.

28s

18s

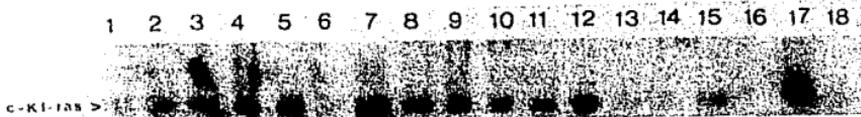


FIGURA 6 AUTORADIOGRAFIA DE LA HIRIDACION DE LOS ARNs CON EL ADnc DEL ONCOGEN C-KI-RAS DE TAMAÑO 0.615 Kd.

La literatura reporta que el oncogen c-Ki-ras se encuentra en algunos casos ligeramente sobreexpresado en adenomas premalignos y en CC (70). En este estudio los resultados mostrarán que existe una ligera sobreexpresión de c-Ki-ras en 2/9 que corresponde al 22% de los tumores analizados.

#### 4.3.4 Hibridación de los ARN con el ADNc de c-myc

La figura 7 muestra los resultados de la expresión del oncogen c-myc. En los pacientes I (1 y 2) y II (3 y 4) no hay diferencias en la expresión de los tejidos normales y tumorales, pero hay una expresión considerablemente mayor. Estas muestras provienen de 2 diferentes tumores uno de recto y otro de colon y con diferentes grados de diferenciación celular, pudiera ser que en el paciente II el tejido "control" contenga alteraciones genéticas que lo llevan a la expresión de c-myc en altos niveles, aunque histológicamente sea considerado tejido normal. El paciente II comparado con el I, presentaban diferencias como son las manifestaciones clínicas, donde el paciente II presentó un tumor más avanzado con metástasis hepática, mucoproducción y pertenece a los moderadamente diferenciados. En cambio el paciente I presentó un tumor bien diferenciado, menos avanzado y con metástasis a serosa. El paciente III (5 y 6) presentó una sobreexpresión de 5.6 veces comparado con el normal, este comparado con el I el cual también es de recto, se encuentra más sobreexpresado y con un mayor avance de la enfermedad. En el paciente IV (7 y 8) hay una sobreexpresión 4.9 veces en el tejido tumoral. Los pacientes V (9 y 10) y VIII (15 y 16) mostrarán una sobreexpresión de 9.7 veces más en el tejido tumoral comparado con el normal, en estos pacientes donde expresarán altos niveles de c-myc, los tumores ya habían invadido ganglios. En el paciente VI (11 y 12) muestra una expresión incrementada 3.8 veces en el tejido tumoral. En los pacientes VII (13 y 14) y IX (17 y 18) hay sobreexpresión en el tejido normal comparado con el tumoral y esto puede ser debido a

una represión de la expresión. Aunque su principal alteración son amplificaciones y traslocaciones.



FIGURA 7 AUTORADIOGRAFIA DE LA HIBRIDACION DE LOS ARN's CON EL ONCOGEN C-MYC CON UN TAMAÑO DE 1.029 Kd.

En la mayoría de los CC se ha reportado sobreexpresión del oncogen c-myc (56,86). Los niveles de c-myc se encuentran incrementados progresivamente en polipos y carcinomas (88). Se ha publicado que los niveles de c-myc en algunos casos de CC han aumentado de 5 -40 m s que en el normal (85). En este estudio se observó sobreexpresión de c-myc en 5/9 el cual corresponde al 55% de los tumores analizados, donde la máxima sobreexpresión fue de 9.7 veces, incluyendo los casos de los tumores benignos que provienen de los pacientes IV (7 y 8) y VI (11 y 12). Cabe enfatizar que en los tumores con metástasis a ganglios la sobreexpresión de c-myc fue mucho mayor que en los otros tumores.

#### 4.3.5 Hibridación de los ARN con el ADnc de c-fos.

La Figura 8 muestra los resultados de la hibridación de los ARNs con el oncogen c-fos. Los pacientes I (1 y 2), III (5 y 6), V (9 y 10), VII (13 y 14), presentarán expresiones similares de c-fos en la muestra tumoral comparada con su normal correspondiente. El paciente II (3 y 4) mostró una sobreexpresión

de 50 veces sobre el tejido normal, este tumor fue el más agresivo que se recolectó y las condiciones físicas del paciente eran deplorables. En el paciente IV (7 y 8) se observó que el tejido tumoral la expresión de c-fos estaba sobreexpresado 3.2 veces. El paciente VI (11 y 12) presentó una sobreexpresión 12 veces sobre su tejido normal. Los pacientes VIII (15 y 16) y IX (17 y 18) mostraron una expresión incrementada en los tejidos normales comparados con los tumorales.

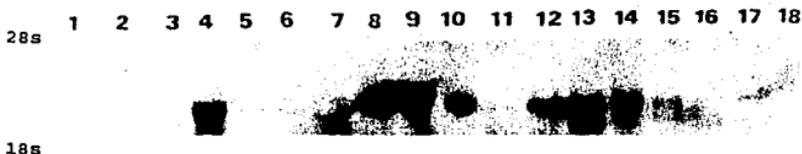


FIGURA 8 AUTORADIOGRAFIA DE L. HIBRIDACION DE LOS ARNs CON EL ADNc DEL ONCOGEN C-FOS QUE CONSTA DE UN TAMAÑO DE 3.026 Kd.

En la literatura existe poca información acerca de la expresión de c-fos en CC, M. Monnat y col (22) publicaron que los niveles de c-fos están incrementados de 2-8 veces en algunos casos de CC y que estos niveles son menores en polipos y adenomas. En el presente estudio los resultados mostrarán que hubo un incremento de la expresión en 3/9 correspondiendo al 33% de los tumores, y la mayor expresión fue de 50 veces, el cual corresponde al paciente II que presentaba metástasis hepática.

De la población de las biopsias tisulares de nueve pacientes sometidas a este estudio, se determinó el siguiente porcentaje de la sobreexpresión de los genes en estudio, estos resultados se muestran en la tabla 5. Dentro de este análisis estadístico se tomaron en cuenta la expresión de los genes en los tumores benignos.

TABLA 5 PORCENTAJE DE LA EXPRESION DE LOS GENES		
GENE	SOBREEXPRESION	PORCENTAJE
AFP	5/9	55.5%
c-Ki-ras	2/9	22.2%
c-myc	5/9	55.5%
c-fos	3/9	33.3%

4.4 Tablas de correlación de la expresión de AFP y los oncogenes con el grado de diferenciación, malignidad y metástasis.

4.4.1 Correlación de la expresión de los genes con el grado de diferenciación.

En la tabla 6 se muestra que la expresión de c-fos y c-myc presentan mayor sobreexpresión en los CC moderadamente diferenciados comparados con los bien diferenciados. En el caso de AFP, presentó sobreexpresión en dos tumores bien diferenciados y en uno moderadamente diferenciado. Es de hacerse notar que en los dos tumores benignos existió sobreexpresión de AFP. El oncogen c-Ki-ras mostró un ligero incremento de su expresión en el tumor del paciente I donde su clasificación histológica pertenecía a los bien diferenciados. En base a estos resultados se observa que en aquellos tumores moderadamente diferenciados las alteraciones de la expresión de los oncogenes fue mayor que en los carcinomas bien diferenciados.

**TABLA 6 EXPRESION DE ALFAFETOPROTEINA, c-fos, c-myc y c-Ki-ras CORRELACIONADO CON EL GRADO DE DIFERENCIACION.**

GRADO DE DIFERENCIACION	AFP	c-fos	c-myc	c-Ki-ras
BIEN	2/4	0/4	1/4	1/4
MODERADO	1/3	1/3	2/3	0/3
POCO	NO SE ANALIZARON TUMORES			

La expresión de c-myc y c-fos en los moderadamente diferenciados fue mayor que en los bien diferenciados. Esta diferencia podría deberse a que los tumores moderadamente diferenciados son considerados generalmente más agresivos que los bien diferenciados y también presentan mayores alteraciones genéticas y metabólicas.

#### 4.4.2 Relación de la expresión de los genes con el grado de malignidad

En la tabla 7 se observa que en el tumor con estadio de malignidad I solo hubo sobreexpresión de AFP. En el tumor con grado de malignidad II se incremento la expresión de c-Ki-ras. En los 3 tumores analizados de malignidad III existió una sobreexpresión de AFP y un incremento notable de la expresión de c-myc en los 3 casos. El paciente II cuyo tumor pertenecía a grado de malignidad IV mostró altos niveles de la expresión del oncogen c-fos. La expresión de los oncogenes c-myc y c-fos principalmente se podrían utilizar como marcadores de la progresión.

TABLA 7 CORRELACION ENTRE LA EXPRESION DE AFP, c-fos, c-myc y c-Ki-ras CON EL GRADO DE MALIGNIDAD.

MALIGNIDAD	AFP	c-fos	c-myc	c-Ki-ras
I	1/2	0/2	0/2	0/2
II	0/1	0/1	0/1	1/1
III	2/3	0/3	3/3	0/3
IV	0/1	1/1	0/1	0/1

La expresión de AFP no se ha estudiado ampliamente en relación con la historia clínica del paciente (101). La determinación de AFP en suero, Khanderia y col (98) la consideran un predictor del curso de la enfermedad. En este estudio la expresión de AFP se incremento tanto en grado de malignidad I como III, es decir tanto en etapas tempranas como avanzadas de la enfermedad. En CC existe una correlación entre expresión de c-myc y estadio de tumor primario que es determinado por extensión local, malignidad, tamaño y metástasis. Al presentar el tumor estadios más avanzados es mayor la expresión de c-myc (84). Los resultados mostrarán que efectivamente en los estadios más avanzados se presentó una mayor sobreexpresión de c-myc. Aunque c-fos ha sido poco estudiado, en la literatura se reporta que hay una correlación entre una gran expresión de c-fos con el avance de la enfermedad (22). Los resultados del presente estudio apoyan los datos antes mencionados.

#### 4.4.3 Correlación de la expresión de los genes con metástasis.

La tabla 8 muestra que en el paciente VII que no presentó metástasis, no hubo expresión incrementada de ninguno de los genes que se analizaron. En el paciente donde tenía una invasión a serosa mostró un incremento de la expresión de c-Ki-ras. En los 3 pacientes con metástasis a ganglios se observó aumento de la

expresión de AFP y c-myc este último en los tres casos. EL paciente II con invasión hepática, la expresión de c-fos se encontró muy incrementada.

TABLA 8 RELACION DE LA EXPRESION DE  $\alpha$ -FETOPROTEINA, c-fos, c-myc y c-Ki-ras CON METASTASIS

Metástasis	AFP	c-fos	c-myc	c-Ki-ras
No hay	0/1	0/1	0/1	0/1
Serosa	0/1	0/1	0/1	1/1
Ganglios	2/3	0/3	3/3	0/3
Hígado	0/1	1/1	0/1	0/1

El aumento de la expresión de AFP está relacionada con células malignas, progresión y crecimiento del tumor (101). En este estudio los niveles de AFP fueron mayores en los tumores con metástasis a ganglios. Se han encontrado correlaciones entre los niveles del producto del oncogen c-Ki-ras ( p21) y el grado de invasividad (78,79). Los resultados de este estudio mostrarán un ligero incremento en la expresión de este oncogen en el paciente que presenta invasión a serosa. Según L.D.Kerr y col (84) los niveles de c-myc y la metástasis están muy correlacionados. En este caso los resultados muestran que realmente al aumentar el grado de metástasis se incrementó la sobreexpresión del oncogen c-myc, principalmente en metástasis cercanas como son a ganglios regionales. El oncogen c-fos presentó mayor sobreexpresión en el tumor con metástasis hepática, en la literatura no hay información acerca de la expresión de este oncogen relacionado con el grado de metástasis.

4.5 Tabla de la expresión de los genes en estudio en los tumores benignos.

En la tabla 9 se puede apreciar que en los pacientes IV y VI

los cuales se diagnosticó tumores benignos colorectales presentarán la siguiente expresión en los genes :

- 1.- El adenoma rectal (paciente IV) una sobreexpresión de AFP, c-myc y c-fos.
- 2.- El polipo del Síndrome de Crohn (paciente VI) presentó expresión incrementada en AFP, c-fos, c-myc y c-Ki-ras.

Tumor benigno	AFP	c-fos	c-myc	c-Ki-ras
Adenoma rectal	6.1	3.2	4.9	-
Síndrome de Crohn	2.5	12.0	3.0	3.7

\* Los valores descritos pertenecen al número de veces que el tumor benigno está sobreexpresado con respecto a su tejido normal.

No se han encontrado datos publicados acerca de la expresión de c-fos y AFP en tumores benignos colorectales. Los resultados de este estudio mostrarán que existen diferencias en la expresión del tejido tumoral con la expresión del normal, estos datos nos indican alteraciones a nivel genético. La expresión del oncogén c-Ki-ras se ha encontrado relacionada entre otros eventos con división celular (34) y en el presente estudio la ligera sobreexpresión de c-Ki-ras podría deberse a que la división celular se encuentra incrementada por la regeneración de las células y al crecimiento del tumor benigno. Forgue-Lafitte y col (88) demostraron que existen alteraciones en la expresión del oncogén c-myc en polipos y carcinomas, aunque en los primeros los niveles son menores. En este análisis los resultados obtenidos muestran que existe un incremento en la expresión de c-myc en los tumores benignos. Aunque esta expresión es menor que en los tumores malignos. Estos datos apoyan lo publicado por Forgue-lafitte.

En relación a la expresión de AFP, c-fos, c-myc y c-Ki-ras con la edad y sexo no se encontró correlación alguna. Cabe puntualizar que todo este estudio es relativo a una pequeña población estudiada y que necesario realizar estudios en un número mayor de casos para un análisis estadístico que nos permita evaluar si la expresión de estos oncogenes puede servir como marcadores de la progresión tumoral del cáncer colorectal.

## V CONCLUSIONES

En el presente trabajo se montaron y optimizaron las técnicas de extracción, purificación e integridad del ARN de los tejidos humanos de cáncer de colon y la de Northern blot para la determinación de la expresión de los oncogenes y de  $\alpha$ -fetoproteína.

De las correlaciones entre la expresión de  $\alpha$ -fetoproteína y los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras con el grado de diferenciación, malignidad y metástasis se concluye que la expresión de los oncogenes c-fos y c-myc es mayor en carcinomas colorectales moderadamente diferenciados y en estadios avanzados de malignidad. Estos datos sugieren que la expresión de estos oncogenes se encuentra más alterada en etapas menos diferenciadas y en etapas avanzadas de la progresión tumoral donde las alteraciones que sufre la célula son múltiples.

En necesario hacer hincapié que en el tumor del paciente con metástasis hepática la expresión de c-fos se encontró muy incrementada y los pacientes con invasión a ganglios presentaron sobreexpresión del oncogen c-myc. Esto podría ser de gran utilidad para determinar la progresión de la enfermedad. La expresión de estos oncogenes podría servir como marcadores de la progresión y malignidad del cáncer colorectal.

La  $\alpha$ -fetoproteína mostró un mayor incremento de su expresión en tumores colorectales bien diferenciados comparados con los moderadamente diferenciados, en estadios de malignidad tanto tempranos como avanzados. Por lo tanto, no se observó una clara correlación entre la expresión de  $\alpha$ -fetoproteína con grado de diferenciación celular y malignidad, con excepción de los dos tumores de recto.

En los tumores benignos de la población estudiada, se observó sobreexpresión de  $\alpha$ -fetoproteína, c-fos y c-myc, en ambos casos. En el polipo del Síndrome de Crohn, mostró incremento en la expresión de los tres genes anteriores y además en el oncogen c-Ki-ras. Es muy probable que al presentar alteraciones en estos genes, estos tumores benignos tiendan a malignizarse y tornarse en cánceres colorectales.

Es necesario ampliar este estudio con una mayor población, tanto de carcinomas colorectales como tumores benignos, para realizar un análisis estadístico y en base a esto determinar si es posible utilizar la expresión de estos oncogenes como marcadores de la progresión tumoral del cáncer colorectal.

## VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- J.L. Amiel, J.Roussé y D.Machover. Manual de Oncología. 1a Edición, España 1978.
- 2.- R.W. de Levin y E. Levin. La prevención del cáncer. Editorial Colihue, Argentina 1978.
- 3.- I.B. Weinstein. The Origins of Cancer: Molecular Mechanics of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatment-Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Research 48,4135-4143,1988.
- 4.- Y. Lee. Incidental Carcinoma of the Colorectum at Autopsy and Its Effects on the Incidence and Future Trends of Colorectal Cancers in Singapore. Cancer 61:1059-1064,1988.
- 5.- M. Ponze de Leon, A. Antonioli, A. Ascar and C. Sacchetti. Incidence and Familial Ocurrance of Colorectal Cancer and Polips in a Health-Care District of Northern Italy. Cancer 60:2848-2859,1987.
- 6.- K. Yoshida, M. Rivoiri and E. R. Sigurdson. Radiolocalization of Monoclonal Antibodies in Hepatic Metastases form Human Colon Cancer in Congenitally Athymic Mice. Cancer Research (suppl) 50,862s-865s,1990.
- 7.- R. Bleday, J. Song, E. Walker and G. Steele. Characterization of a New Monoclonal Antibody to a Cell Surface Antigen on Colorectal Cancer and Fetal Gut Tissues. Cancer 57:433-440.1986.
- 8.- D. Butcher, K. Hassanein J. Rhodes and F. Holmes. Female Gender Is a Major Determinant of Changing Subsite Distribution of Colorectal cancer With Age. Cancer 56:714-716,1985.

- 9.- J. E. Berk, W. S. Haubrich, J. L. A. Roth and F. Bockus. Gastroenterología. Tomo IV 4ª Edición. Salvat Editores,S.A. España, pp 2765-2813,1987.
- 10.- C. S. Muir. Epidemiology, Basic Science, and the Prevention of Cancer: Implications for the Future. Cancer Research 50,6441-6448,1990.
- 11.- P.Rozen, H.T.Lynch, A.Figer, W.Kimberling and P.Watson. Familial Colon Cancer in the Tel-Aviv Area and the Influence of Ethnic origin. Cancer 60:2355-2359,1987.
- 12.- B. I. Carr. Chemical Carcinogens and Inhibitors of Carcinogenesis in the Human Diet. Cancer 55:218-224,1985.
- 13.- M.M. Meguid and V. Meguid. Preoperative Identification of the Surgical Cancer Patient in Need of Postoperative Supportive Total Parenteral Nutrition. Cancer 55:258-262,1985
- 14.-T.B.Young and D.A.Wolf. Case-Control Study of Proximal and Distal Colon Cancer and Diet in Wisconsin. Int.J.Cancer : 42,167-175,1988.
- 15.- J. L. Freudenheim, S. Graham, R. Marshall and P. Haughey. Risks Associated with Source of Fiber and Fiber Components in Cancer of the Colon and Rectum. Cancer Research 50,3295-3300,1990.
- 16.- J.A.Tayek, L.Bulcavage and R.T.Chlebowski. Relationship of Hepatic Glucose Production to Growth Hormone and Severity of Malnutrition in a Population with Colorectal Carcinoma. Cancer Research 50,2119-2122,1990.
- 17.- C. La Vecchia, E.Negri and S.franceschi. A Case-Control Study of Diet and Colo-Rectal Cancer in Northern Italy. Int. J. Cancer : 41,492-498,1988.

- 18.- G.Biasco, G.M.Paganelli, G.Gizzi and L.Barbara. Rectal Cell Proliferation and Colon Cancer Risk in Ulcerative Colitis. *Cancer Research* 50,1156-1159,1990.
- 19.- M. Sasaki, K. Sugio and T. Sasazuki. K-ras Activation in Colorectal Tumors From Patients with Familial Polyposis Coli. *Cancer* 65:2576-2579,1990.
- 20.- O.A. Hietala, J. Pilon, K. O'Donnell, I. Kline and T.G. O'Brien. Properties of Onithine decarboxylase in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Cancer Research* 50,2088-2094,1990.
- 21.- B.G. Heerdt, H. Halsey, M. Lipkin and L.H. Augenlicht. Expression of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase in Human Colonic cell Differentiation, transformation, and Risk for Colonic Cancer. *Cancer Research* 50, 1596-1600,1990.
- 22.- M. Monnat, S. Tardy, P. Saraga and J. Costa. Prognostic Implications of Expression of the Cellular Genes myc, fos, Ha-ras y Ki-ras in Colon Carcinoma. *Int. J. Cancer* 40,293-299,1987.
- 23.- M. Maruyama, M. Fukayama and M.Koike. A Case of Multiple Carcinoid tumors of the rectum with Extraglandular Endocrine Cell Proliferation. *Cancer* 61:131-136,1988.
- 24.- G. Klein, and E. Klein. Condicioned tumorogenecity of Actived Oncogenes. *Cancer Research* 46,3211-3223,1986.
- 25.- J.M. Bishop. The Molecular Genetics of Cancer. *Science* vol.235,305-311,1987.
- 26.- B.J. Barrow, M.A. O'Riordan and T.P. Pretlow. Enzyme-altered Foci in Colons of Carcinogen-treated Rats. *Cancer Research* 50, 1911-1916,1990.

27.- K. Ambe, M. Mori and M. Enjoji. S-100 Protein-Positive Dendritic Cells in Colorectal Adenocarcinomas. Cancer 63: 496-503,1989.

28.- M.S. Naylor. G. Stamp and R. Balkwill. Investigation of Cytokine Gene Expression in Human Colorectal cancer. Cancer Research 50,4436-4440,1990.

29.- D.J. Bagli, I. Summerhayes and T. Barlozzari. c-Ha-ras-I Oncogen - Induced Differentiation and Natural Killer Resistance in a Human Colorectal Carcinoma Cell Line. Cancer Research 50,2528-2523,1990.

30.- R.M. Sharkey, D. Gold, R. Aninipot, R. Vagg and D. Goldenberg. Comparasion of Tumor targeting in Nude Mice by Murine Monoclonal Antibodies Directed againts Different Human Colorectal Cancer Antigens. Cancer Research (suppl) 50, 828s-834s,1990.

31.- K. Mafune, T. Ravikumar, L .B. Chen and G.D. Steele. Expression of a Mr 32,000 Laminin-Binding Protein Messenger RNA in Human Colon Carcinoma Correlates with Disease Progression. Cancer Research 50,3888-3891,1990.

32.- Y. Hamada, M. Yamamura, M. Yamamoto and K. Watanabe. Immunohistochemical Study of Carcinoembryonic Antigen in Patients with Colorectal Cancer. Cancer 55:136-141,1985.

33.- B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. E. Kern, R. White and J.L.Bos Genetic Alteratios During Colorectal Tumor Develoment. The New England, Journal of Medicine vol 319,525-532,1988.

34.- K.Takahashi, U. Heine, J.L.Junker and J.M.Rice. Role of Cytoskeleton Changes and Expression of the H-ras Oncogene during

Promotion of Neoplastic Transformation in Mouse Epidermal JB6 Cells. Cancer Research 46,5923-5932,1986.

35.- J. Yocota, Y. Tsunetsugo-Yocota, and M.J. Cline. Alterations of myc,myb and Ha-ras Proton-cogene in Cancers are frequent and Show Clinical Correlation. Science vol 231,261-265,1986.

36.- C. Willman, C.C. Stewart, J.K. Griffith and T.B.Thomas. Differential Expression and Regulation of the c-src and c-fgr protoncogenes in Myelomonocytic Cells. Proc. Natl. Acad. Sci vol 84,4480-4484,1987.

37.- Y. Graziani, J.L. Maller, Y. Sugimoto and R.L. Erickson. Modification of the Activity of the Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase by pp60src. Cancer Cells pp 27-35,1990.

38.- M.M. Burger, M. Barbacid and C.D. Stiles. UICC Study Group on Basic and Clinical Cancer research: Growth Factors, Receptors and Oncogenes. Int. J. Cancer 41,1-4,1988.

39.- J.S. Flier, M.M. Mueckler, P. Usher and H.F. Lodish. Elevated Levels of Glucose transport and Transporter messenger RNA are Induced by ras or src Oncogenes. Science vol 235, 1492-1495,1987.

40.- AACR Special Conference in Cancer research. Steroid Receptors, Transcription Factors, and Gene Expression. Cancer Research 50,6430-6435,1990.

41.- R.A. Weinberg. A Molecular Basis of Cancer. Scientific American,pp 126-142,1983.

42.- H. Bleiberg, M. Buyse, and P. Galand. Cell Kinetic Indicators of Premalignant Stages of Colorectal Cancer. Cancer, 56:124-129,1985.

43.- A. J. Best, P .K. Das, and H. R. H. Patel. Quantitative Cytochemical Detection of Malignant and Potentially Malignant Cells in the Colon. Cancer Research 50,5112-5118,1990.

44.- K. M. Mulder, Q. Zhong, and M. G. Brattain. Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor B1 on Mitogenetic Response, Transforming Growth Factor A, and c-myc in Quiescent, Well-Differentiated Colon Carcinoma Cells. Cancer Research 50,7581-7586,1990.

45.- D.M. Radford, H. Nakai and T.B. Shows. Two Chromosomal Locations for Human Ornithine Decarboxylase Gene Sequences and Elevated Expression in Colorectal Neoplasia. Cancer Research 50,6146-6153,1990.

46.- U.M. Wewer, L.A. Liotta and M.E. Sobel. Altered Levels of Laminin Receptor mRNA in Various Human Carcinoma Cells that have Different Abilities to Bind Laminin. Proc. Natl. Sci. USA 83,7137-7141,1990.

47.- A. Wiley. Metastasis. Ed. Jonh Wiley & Sons Ltd. Chichester, U.K.pp 5-21,1988.

48.- J. Lundy, F. Mornex and D. Colcher. Radioimmunodetection of Human Colon Carcinoma Xenografts in Visceral Organs of Congenitally Athymic Mice. Cancer 57,503-509,1986.

49.- R.S. Bresalier, R.W. Rockwell and Y.S. Kim. Cell Surface Sialoprotein Alterations in Metastatic Murine Colon Cancer Cell Lines Selected in an Animal Model for Colon Cancer Metastasis. Cancer Research 50,1299-1307,1990.

50.- P.H.A.Quax, R.T.J.van Leeuwen and J.H.Verheijen. Protein and Messenger RNA Levels of Plasminogen Activators and Inhibitors

Analyzed in 22 Human Tumor Cell Lines. Cancer Research 50,1488-1494,1990.

51.- N. Kemeny, D. Niedzwiecki and P. Oderman. Prognostic Variables in Patients With Hepatic Metastases From Colorectal Cancer. Cancer 63,742-747,1989.

52.- Y.Z. Patt, C.M. McBride and G.M. Mavligit. Adjuvant Perioperative Hepatic Arterial Mitomycin C and Floxuridine Combined With Surgical Resection of Metastatic Colorectal Cancer in the Liver. Cancer 59,867-873,1987.

53.- E.S. Newlands. Cancer Assessment and Monitoring Tenth Pfizer International Symposium. Bell & Bain Ltd, Glasgow, Churchill Livingstone Great Britain, pp. 311-321,1980.

54.- A. Quentmeier, F. Möller and P. Schlag. Carcinoembryonic Antigen, CA19-9, and CA 125 in Normal and Carcinomatous Human Colorectal Tissue. Cancer 60,2261-2266,1987.

55.- B. Dudouet, L. Jacob and D. Louvard. Presence of Villin, a Tissue-specific Cytoskeletal Protein, in Sera of Patients and an Initial Clinical Evaluation of Its Value for the Diagnosis and Follow-up of Colorectal Cancer. Cancer Research 50, 438-443,1990.

56.- M.D.Erisman, S.Litwin and S.M.Astrin. Noncorrelation of the Expression of the c-myc Oncogene in Colorectal Carcinoma with Recurrence of Disease or Patient Survival. Cancer Research 48,1350-1355,1988.

57.- E. Chu, S. Zinn and C.J. Allegra. Interaction of gamma-Interferon and 5-Fluoracil in the H630 Human Colon Carcinoma Cell Line. Cancer Research 50,5834-5840,1990.

58.- S.K. Shuja and S. Murnana. Cysteine Protease Activities and

Tumor Development in Human Colorectal Carcinoma. Cancer Research 49,3809-3814,1989.

59.- R.A. Weinberg. Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 3-11, 45-50, 67-88, 125-140, 147-165, 281-295, 307-327. USA,1989.

60.- T. D. Adamson. Oncogenes in Development. Development 99,449-471,1987.

61.- H. Masuda, H. Battifora and M.J. Cline. Specificity of Proto-oncogene Amplification in Human Malignant Diseases. Mol. Biol. Med. 4,213-227,1987.

62.- P.H. Duesberg. Activated Proto-onc Genes: Sufficient or Necessary for Cancer. Science 228,669-677,1985.

63.- T. Hunter. Oncogenes and Proto-oncogenes: How Do They Differ? Jnci. 73,773-784,1986.

64.- D. L. Trainer, T. Kline and R. Greig. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. Inter. J. Cancer 41,287-296,1988.

65.- T. Hunter. Cooperation Between Oncogenes. Cell 64 249-270,1991.

66.- R.A. Weinberg. The Action of Oncogenes in the Cytoplasm and Nucleus. Science 230,770-776,1985.

67.- M. Cross and M. Dexter. Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis. Cell 64 271-280,1991.

68.- C.L. Auger, K.R. Carpenter and Ch. Duckworth. Oncogenes and Signal Transduction. Cell 64,281-302,1991.

- 69.- J.F. Heffron and E. Bergmann. Conformational Changes Involved in the Activation of ras p21. Implications for Related Proteins. Cell 60,525-528,1990.
- 70.- J.S. Wainscoat and L. Thein. Polymorphism in Human DNA: Application to Cancer Studies. TIBS 474-476,1985.
- 71.- K. Forrester, C. Almoguera and M. Perucho. Detection of High Incidence of K-ras Oncogenes During Human Colon Tumorigenesis. Nature 327,298-303,1987.
- 72.- D.J. Capon, P.H. Seeburg and D.V. Goeddel. Activation of Ki-ras2 Gene in Human and Lung Carcinomas by Two Different Point Mutations. Nature 304,507-513,1983.
- 73.- F. McCormick. ras GTPase Activating Protein: Signal Transmitter and Signal Terminator. Cell 56,5-8 1989.
- 74.- M.V. Tong and Z. Yamazumi. Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenes ras Proteins. Science 247,939-944,1990.
- 75.- T. Hunter. The Proteins of Oncogenes. Scientific American 251 (2), 60-69,1984.
- 76.- Y. Nagata, M. Abe and H. Shiku. Glycine to Aspartic Acid Mutations at Codon 13 of the c-Ki-ras Gene in Human Gastrointestinal Cancers. Cancer Research 50,480-482,1990.
- 77.- M. Perucho, K. Forrester C. Almoguera and W.E. Grizzle. Expression and Mutational Activation of the c-Ki-ras in Human Carcinomas. Cancer Cells 7,137-141,1989.
- 78.- T.D. Cornil, B.J. Fernández and R.S. Kerbel. Overexpression of

Normal and Muted Forms of Ha-ras Induced Orthotopic Bladder Invasion in a Human Transitional Cell carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 87,9047-9081,1990.

79.- J.L. Boss. ras Oncogene in Human Cancer. Cancer Research 49, 4682-4689,1989.

80.- T. Hunter. Cooperation Between Oncogenes. Cell 64, 249-270,1991.

81.- J.T. Parsons, D.Bryant and S.J. Parsons. Site-Directed Mutagenesis of Rous Sarcoma Virus pp60src Identification of Funtional Domains Requiered for Transformation. Cancer Cells 2,37-42, 1989.

82.- R.C. Parker and J.M. Bishop. Transduction and Alteration of a Cellular Gene (c-src) Created an RNA Tumor Virus: Genesis of Tous Sarcoma Virus. Cancer Cells 2,19-25, 1990.

83.- H.Hanafusa, H.Iba, and F.R.Cross. Transforming Activity of the c-src Gene. Cancer Cells 2, 1-7, 1990.

84.- L.D.Kerr, J.T.Holt and L.M.Matrisian. Growth Factors Regulate Transin Gene Expression by c-fos-dependent and c-fos-Independent Pathways. Science 242,1424-1427,1988.

85.- M.D.Erisman, P.G.Rotherberg and S.M.Astrin. Deregulation of c-myc Gene Expression in Human Colon Carcinoma Is Not Accompanied by Amplification or Rearrangement of the Gene. Molecular and Cellular Biology 5,1969-1976,1985.

86.- M.Gutman, Y.Ravia and Y.Shiloh. Amplication of c.myc and c-erbB-2 Protoncogenes en Human Solid Tumors: Frequency and Clinical Significance. Int. J. Cancer 44, 802-805,1989.

87.- K.M. Mulder, and M.G. Brattain. Alterations in c-myc Expression in Relation to Maturational Status of Human Colon Carcinoma Cells. *Int. J. Cancer* 42,64-70,1988.

88.- M. E. Fogue-Lafitte, A. M. Coudray and J. Mester. Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene. *Cancer Research* 49, 6566-6571,1989.

89.- S.R.Umesono, D.Bolado and R.Evens. jun-fos and Receptors for Vitamins A and D. Recognize a Common Response Element in the Human Osteocalcin Gene. *Cell* 61,497-504,1990.

90.- H. Fang, J.C. Chambard and Y. Sun. Transcriptional Interference Between c-jun and the Glucocorticoid Receptors: Mutual Inhibitor of DNA-binding Due to Direct protein-Protein Interactions. *Cell* 62,1205-1215,1990.

91.- V. Baichual and R. Tjian. Control of c-jun Activity by Interactions of a Cell Specific Inhibitor with Regulatory Domain ( $\delta$ ): Differences Between v-jun and c-jun. *Cell* 63,815-825,1990.

92.- L. Brooks, M. Laufer and E. Land. Domains of Human c-myc Protein Required for Autosuppression and Cooperation with ras Oncogenes are overlapping. *Molecular and Cellular Biology* 10,4961-4966,1990.

93.- M. Smith, D. Charron and E. Prochawnick. The Leucine Zipper of c-myc Is Required for Full Inhibition of Erythroleukemia Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 10,5333-5339,1990.

94.- P. Hind, C. Finlay and A.J. Levine. Mutation is Required to Activate the p53 Gene for Cooperation with the ras Oncogene on the Transformation. *Journal of Virology* 63,739-746,1989.

- 95.- D. Eliyuhu, D. Michalovitz and M. Oren. Wild-Type 53 Can Inhibit Oncogenes Mediated Focus Formation. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 8763-8767, 1989.
- 96.- R. Villey, P. Letellier and P. Boutard. Diccionario Práctico de Síntomas y Síndromes. Masson Barcelona-México pp 9, 1983.
- 97.- M. K. Schwartz. Advances in the Use of Tumor Markers. Compressive Therapy 16(11), 51-57, 1990.
- 98.- U. Khanderia and B. Grossman. Evaluation of N-Acetylneuraminic Acid, Carcinoembryonic Antigen and Alpha-Fetoprotein as Markers for Advanced Carcinoma. Journal of Surgical Oncology 37, 264-268, 1988.
- 99.- W. Gonsoulin, B. Mason and R.J. Carpenter. Colon Cancer in Pregnancy with Elevated Maternal Serum Alpha-Fetoprotein Level at presentation. Am. J. Obstret Gynecol. 163(4 pt 1) 1172-1173, 1990.
- 100.- M.J. Rindler and M.G. Traber. A Specific Sorting Signal is not Required of Newly Synthesized Proteins from Cultured Intestinal Epithelial Cells. J. Cell Biology 107(2) 471-479, 1988.
- 101.- S. Sell and F.F. Becker. Alpha-Fetoprotein. J. Natl. Cancer Inst. 60, 19-26, 1978.
- 102.- V. Abbasciano, F. Levato and G. Zavagli. Specificity of Tumor Marker (CEA, GICA, TPA, alpha-FP, FPA and gama-GT) for the Diagnosis of Hepatic Metastases from Large Bowel Cancer. Med. Oncol. Tumor Pharmacother 6(2) 129-132, 1989.
- 103.- Registro Nacional del Cáncer. Resultados 1988, Ciudad de México. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Crónicas y Accidentes. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Datos aún no publicados.

104.- Characterization of human Colon/LungCarcinoma Oncogene.  
Nature Vol 302, March 1983.

105.-T. Maniatis, E.F. Fritsch. Molecular Cloning a Laboratory  
Manual. 2a. Edición. Cold Spring Harbor Press, 1989.