



70  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS DE PROTEINAS in vivo DE TUMORES MALIGNOS  
DE COLON POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

TESIS EXPERIMENTAL

que para obtener el titulo de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
( Bioquimico Microbiológica )

p r e s e n t a :

ALMA ANGELICA HERNANDEZ RAMIREZ

MEXICO, D. F.,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## Indice

	Pag.
Resumen	7
Introducción	9
Hipótesis	12
Objetivos	13
Generalidades	14
I. Conceptos generales	14
1.1 Definición de tumor	14
1.2 Definición de tumor benigno	15
1.3 Definición de tumor maligno	15
1.4 Nomenclatura de los tumores malignos	17
II. Los orígenes del cáncer humano	17
2.1 Etapas en la formación de un tumor	18
2.1.1 Iniciación	18
2.1.2 Promoción	19
2.1.3 Progresión	22
2.2 Oncogenes	23
2.2.1 Estrategias en la caracterización de oncogenes y protooncogenes	24
2.2.2 Actividad oncogénica	25
2.3 Genes supresores de tumor	26
2.4 Mecanismos de invasividad	28
2.5 Factores de crecimiento y receptores hormonales	31
2.6 Marcadores tumorales	33
2.7 Antígenos tumorales	35

III. Tumores benignos de colon	35
3.1 Clasificación de tumores polipoides de colon	37
3.2 Frecuencia y distribución	39
3.3 Etiología	40
IV. Tumores malignos de colon y recto	40
4.1 Anatomía patológica	41
4.1.1 Rasgos macroscópicos	41
4.1.2 Rasgos microscópicos	41
4.1.3 Tipos histológicos	42
4.2 Alteraciones cromosómicas y proteínas oncogénicas en cáncer colorrectal	44
4.3 Etiología	47
4.4 Epidemiología	51
4.4.1 Distribución del cáncer de colon por grupos de edad	51
4.4.2 Distribución del cáncer de colon por sexo	52
4.5 Factores de riesgo	52
4.5.1 Cáncer colorrectal previo	52
4.5.2 Adenomas colorrectales esporádicos, aislados y múltiples	53
4.5.3 Enfermedad inflamatoria intestinal	53
4.5.4 Síndromes hereditarios de poliposis	53
4.6 Manifestaciones clínicas del cáncer colorrectal	54
4.7 Diagnóstico	56
4.8 Prevención	58

Materiales y aparatos de laboratorio	60
I. Reactivos para la determinación de proteínas	60
II. Reactivos para la electroforesis bidimensional	60
III. Reactivos para la tinción con plata	62
IV. Aparatos	62
Preparación de reactivos	63
I. Electroforesis bidimensional	63
II. Inhibidores de proteasas	66
III. Tinción con plata	66
IV. Material biológico empleado	66
Metodología	68
I. Electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales	68
1.1 Determinación del contenido de proteínas por gel	68
1.2 Preparación de la muestra	69
1.3 Elaboración de los geles para la primera dimensión	71
1.4 Elaboración de los geles para la segunda dimensión	73
II. Tinción con plata	74
Resultados y discusión	76
I. Análisis de las proteínas por electroforesis bi- dimensional en ausencia de inhibidores de proteasas	76

1.1 Determinación del contenido de proteínas por gel	76
1.2 Geles de poliacrilamida en dos dimensiones en ausencia de inhibidores de proteasas de tumores moderadamente diferenciados	80
A) Análisis de los tumores moderadamente diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas	81
1.3 Geles de poliacrilamida en dos dimensiones de tumores bien diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas	84
B) Análisis de tumores bien diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas	86
II. Análisis de las proteínas por electroforesis bidimensional en presencia de inhibidores de proteasas	88
2.1 Gel de poliacrilamida en dos dimensiones en presencia de inhibidores de proteasas	89
2.2 Comparación de los patrones proteicos de tejidos tumorales y controles	89
Conclusiones	93
Apéndice	96
Tabla A	97
Tabla B	97
Tabla C	98
Bibliografía	99

Resumen

Este trabajo se llevo a cabo con el fin de estudiar la expresion de proteinas de tumores de colon en distintos grados de diferenciacion, asi como del tejido normal proveniente de diferentes pacientes. Se realizo una revision bibliografica sobre los aspectos generales que conciernen al cancer de colon incluyendo las distintas teorias que existen sobre su origen, aspectos moleculares involucrados, etiologia, epidemiologia y tratamiento, con el proposito de elaborar un marco teorico que sirva como soporte del trabajo experimental.

El analisis de las proteinas de tumores frescos bien diferenciados y medianamente diferenciados, asi como de la proteinas del correspondiente tejido control (normal) se hizo en geles bidimensionales de poliacrilamida en diferentes condiciones de trabajo que se mencionan a continuacion: a) en la primera serie de geles las muestras fueron colectadas en hielo seco y procesadas a -70 C en ausencia de inhibidores de proteasas, y b) en la segunda serie de geles las muestras fueron colectadas en nitrogeno liquido y se usaron como inhibidores de proteasas Pepstatin A y Benzamidina. En los geles se identificaron aquellas proteinas que se expresan, que no se expresan o que se sobreproducen en relacion al control normal. Los resultados de la primera serie muestran diferencias en 15 de las proteinas analizadas en tumores medianamente diferenciados en relacion al control normal. Las diferencias en la

expresión de proteínas en tumores bien diferenciados fue en número de 11 proteínas.

En la segunda serie de geles se identificaron las mismas proteínas que en la primera serie. Las diferencias mostradas en ambas condiciones de trabajo son mínimas, sin embargo en la segunda serie se observaron mayor número de proteínas de alta masa molecular esto por el efecto de los inhibidores de proteasas en el tejido.

Cabe destacar la presencia de cuatro proteínas de masa molecular 22,000, 22,500, 35,700 y 34,200 Da presentes únicamente en el tejido tumoral. sentando las bases para estudios posteriores en la identificación y caracterización de las mismas con el propósito de ser utilizadas como proteínas marcadoras del estado neoplásico en el colon.

## Introducción

El conocimiento actual de la biología del cáncer proporciona una imagen dinámica del fenómeno, no como un hecho mágico e insólito, sino como un proceso que comprende al menos dos pasos, uno que es el de la transformación de una célula normal a una célula neoplásica y otro que es la adquisición de la propiedad de dividirse aceleradamente y sin obedecer a ningún tipo de control. La célula neoplásica presenta diversas características que la diferencian de la célula normal, entre éstas se presentan cambios bioquímicos y morfológicos específicos, como resultado de la modificación de su información genética.

En países desarrollados existe una gran prevalencia del cáncer de colon en cuanto a la incidencia de mortalidad y morbilidad. En México, sin embargo, el cáncer de colon no se encuentra dentro de los 10 tipos de neoplasia más frecuentes en la población (Tabla A) (Fuente: Registro Nacional de Cáncer, D.G.E./SSA.MEX, 1987), aunque si lo podemos encontrar en el XIII lugar en cuanto a la incidencia de morbilidad en hombres y XIV lugar en mujeres, por lo que se le considera de gran importancia para la salud pública. Es necesario hacer notar que en la actualidad la investigación básica en la bioquímica del cáncer de colon humano en nuestro país es incipiente, por lo que es de considerarse la importancia de este tipo de estudios y su proyección en el futuro.

En países como Estados Unidos, Inglaterra y Francia, entre otros, se desarrolla una amplia investigación dentro de esta área. Es necesario hacer hincapié que la gran mayoría de los trabajos mencionados son realizados con líneas celulares de tumores de colon y que debido a los cambios que puede sufrir la célula, por el hecho de ser una línea establecida, los resultados, aunque son confiables, no son un reflejo fiel de lo que ocurre dentro del ser humano, por lo que deben ser tomados con reserva.

El presente trabajo tiene como objetivo principal el analizar algunos aspectos de la expresión genética de los tumores de colon y recto y del tejido adyacente de la mucosa normal a través del análisis de las proteínas presentes "in vivo" mediante electroforesis bidimensional y visualizadas con plata. Se seleccionó la electroforesis bidimensional como método de separación de las proteínas, debido a que permite la detección de proteínas de complejas fuentes biológicas, separándolas por su punto isoelectrico en la primera dimensión y por peso molecular en la segunda dimensión. La tinción con nitrato de plata se utilizó por presentar una alta sensibilidad y reproducibilidad. Las muestras analizadas provinieron de pacientes que presentaron adenocarcinomas de colon o de recto en distintos grados de diferenciación (medianamente y bien diferenciados), con el fin de encontrar proteínas características del grado de anaplasia de las células tumorales.

Se espera que este trabajo sea el inicio de una serie de experimentos que lleven a identificar alguna proteína que pueda servir como marcador del cáncer de colon y de recto y poder utilizar con fines diagnósticos. Este último es uno de los problemas más importantes sobre los que trabajan bioquímicos, genetistas, biólogos y clínicos en la actualidad.

## Hipótesis

La célula normal al perder el control sobre sus mecanismos de regulación adquiere características completamente diferentes de la célula que le dió origen, convirtiéndola en una célula tumoral. Estas características se manifiestan bioquímicamente en forma de proteínas que son detectables en el laboratorio. El presente trabajo pretende demostrar que existen diferencias entre la célula normal del colon y la tumoral con base en la comparación de la presencia o ausencia de ciertas proteínas en los patrones electroforéticos bidimensionales provenientes de tejido de la mucosa del colon en ambas condiciones. Igualmente se pretende encontrar proteínas que sean características del estado neoplásico para poder en un futuro utilizarlas como marcadores tumorales en el cáncer de colon.

## Objetivos

En el presente trabajo se analizarán las proteínas de tumores frescos de colon y recto medianamente diferenciados y bien diferenciados, así como de la mucosa normal, con el fin de obtener información acerca de cambios metabólicos que presenta la célula tumoral, expresados como proteínas relacionadas con el estado neoplásico, o bien, con el estado de diferenciación celular.

Se analizará el efecto de proteasas presentes en el tejido humano a través de la inhibición de su actividad con Pepstatin A y Benzamidina.

## Generalidades

### I. Conceptos generales

#### 1.1 Definición de tumor

El crecimiento celular es un proceso cuidadosamente regulado por la célula normal respondiendo a necesidades específicas del organismo. La proliferación de células es regulada por factores de crecimiento de naturaleza polipeptídica. Estos factores interactúan con receptores celulares específicos que a su vez emiten señales a través de la fosforilación de proteínas para la síntesis de DNA y la división celular (17, 21) (ver sección 3.5).

Ocasionalmente, los controles que regulan la multiplicación celular no funcionan adecuadamente y comienza a darse un proceso en el cual existe proliferación de células que el cuerpo no necesita. Cuando estas células hijas también adquieren la capacidad de crecer sin regularse se forma una masa de células que constituyen a lo que se denomina un tumor (3). Debido al riesgo que representa la presencia de tumores en el individuo y a las características propias del tumor, se han clasificado como tumores benignos y tumores malignos (4).

### 1.2 Definición de tumor benigno

Se les llaman tumores benignos a aquellos que no representan riesgo al huésped debido que están muy localizados, es decir que no invaden tejidos adyacentes. Otra característica importante de este tipo de tumor es que sus células integrantes son muy semejantes a las que les dieron origen y pueden funcionar como éstas. Los tumores benignos se convierten en un problema serio cuando comienzan a interferir con las funciones normales del organismo.

### 1.3 Definición de tumor maligno

Los tumores malignos son aquellos que amenazan la vida del individuo, presentando ciertas características que lo diferencian del tumor benigno (3,13). La célula que lo constituye se encuentra alterada profundamente, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional, metabólico, antigénico y genético (3). Tiene distintas características que la diferencian de la célula que le dió origen, como son la adquisición de la capacidad de crecer aceleradamente, invadir los tejidos vecinos y/o producir metástasis (2, 13).

Las alteraciones morfológicas que presentan las células tumorales son el resultado o la expresión de las alteraciones tanto bioquímicas como genéticas que sufre la

célula tumoral durante la transformación y progresión maligna y que además son los últimos en manifestarse (8).

Debido a la anaplasia (término que se refiere a la pérdida en mayor o menor grado de la diferenciación que tenía la célula que le dió origen) que se presenta como rasgo fundamental en la célula tumoral maligna, las células presentan características de pleomorfismo nuclear y celular, el tamaño de la célula e incluso del núcleo es mayor, núcleos hiper cromáticos, la relación nucleocitoplasmática puede llegar a ser casi de 1 a 1 en vez de ser de 1 a 4 ó de 1 a 6 como en la célula adulta diferenciada. La morfología nuclear también es muy variable y la cromatina puede encontrarse en masas y distribuida a lo largo de la membrana nuclear. Se observan muchos nucleolos prominentes, que es un índice morfológico del aumento de la capacidad de síntesis de las células. Mientras más anaplásico es un tumor generalmente se observan mayor número de mitosis siendo estas anormales, ya que el huso acromático en vez de tener dos polos puede tener tres o más y así los cromosomas distribuirse de una manera más anárquica. Esto es lo que se conoce como mitosis bipolares, tripolares, tetrapolares o multipolares y se observa solamente en las neoplasias malignas. Hay cambios en las estructuras internas tales como la acentuación de la cromatina nuclear, en agregados a lo largo de la membrana nuclear, la simplificación del retículo endoplásmico rugoso, aumento de los ribosomas libres,

pleomorfismo de las mitocondrias, en ocasiones con cristales o cristaloides en su interior y además desorganización en su citoesqueleto (13). Esta alteración en el fenotipo puede deberse a que existan continuos cambios en el genotipo, ya que existe un número anormal e inestable de cromosomas, así como muchas anomalías cromosómicas.

#### 1.4 Nomenclatura de los tumores malignos

Las células normales de un organismo superior están subdivididas de acuerdo al origen embrionario del tejido al que pertenecen, por lo que también la nomenclatura de los tumores se establece así. Hay que recordar que las células normales provienen de una de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo o mesodermo. Cuando un tumor maligno proviene del endodermo o ectodermo se la llama carcinoma y cuando proviene del mesodermo se le llama sarcoma. Las leucemias, que son una subdivisión de los sarcomas, crecen como células individuales de la sangre, mientras que la mayoría de los tumores restantes son masas sólidas (3, 4).

## II. Los orígenes del cáncer humano

Estudios epidemiológicos aportan la evidencia de que existen factores externos como agentes químicos, radiaciones y virus que juegan un papel muy importante en la generación

del cáncer humano. El cáncer humano es una combinación de los efectos de estos factores (3, 12, 17), que confluyen para producir una alteración a nivel del DNA, RNA y/o proteínas.

## 2.1 Etapas en la formación de un tumor

La mayoría de los autores coinciden en que el cáncer es un proceso en el que se presentan etapas definidas: iniciación, promoción y progresión. La transición entre cada uno de estos estados depende de factores exógenos y endógenos (13).

En el cáncer colorrectal, por ejemplo, la inducción de tumores mediante sustancias químicas está constituida, por dos o varios procesos distintos: un hecho inicial irreversible, la iniciación, y una serie de acontecimientos llamados de promoción, sucesivos y quizá múltiples. A continuación se detallarán las etapas de la formación del cáncer.

### 2.1.1 Iniciación

Muchos tipos de agentes químicos inician el proceso de la carcinogénesis mediante la unión covalente al DNA celular causándole daño, como son las aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos compuestos

cambian la conformación del DNA y sus funciones durante la replicación y la transcripción. La modificación del DNA por agentes metilantes o etilantes, causan trastornos funcionales interfiriendo directamente con el apareamiento de bases, en vez de causar cambios en la conformación (17).

Cuando el DNA es dañado puede sufrir alteraciones de diversos tipos como son mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, amplificaciones, y transposiciones de genes llamados protooncogenes y de otros genes que se relacionan con la formación del tumor (17).

#### 2.1.2 Promoción tumoral

Los promotores tumorales pueden ser definidos como compuestos que pueden presentar o no una actividad carcinogénica muy leve pero que potencian la producción de un tumor cuando son aplicados repetidamente, seguida de una pequeña dosis de algún carcinógeno (iniciador). En cultivos celulares pueden provocar cambios a nivel epigenético uniéndose a receptores de membrana.

La evolución del tumor depende de las sustancias promotoras. Si la acción promotora es débil los tumores formados son generalmente benignos. Estos tumores son generalmente reversibles y desaparecen si la estimulación

cesa. En estos estadios iniciales, las células responden a la regulación de la diferenciación perdiendo así su carácter tumoral. En el caso de la carcinogénesis química como en la vírica, la activación de un protooncogene no puede entrañar la transformación si la actividad de los otros genes celulares no lo permiten. El carácter maligno de los tumores inducidos por agentes químicos aumenta si la acción promotora persiste. Aunque se ha hablado de iniciación y de promoción como fenómenos aislados, ambos efectos se pueden presentar en una misma sustancia. Los carcinógenos químicos de doble acción son potentes reactivos químicos capaces de dañar al DNA y al RNA y promover el desarrollo del tumor.

Se conocen realmente muy pocos ejemplos de promotores y de su manera de acción, pero se sabe que no se unen al DNA sino que producen sus efectos iniciales a un nivel epigenético. Un ejemplo es el TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), el cual induce cambios fenotípicos en cultivos celulares de células de piel de ratón. La respuesta de este agente promotor es la de activar a la enzima PKC (proteincinasa) (17).

La sobreexpresión de PKC altera el control del crecimiento. Esta produce una cascada de eventos los cuales incluyen alteraciones en la función de los canales de iones asociados a la membrana, en la expresión genética y por último, cambios en la diferenciación celular y

proliferación, es decir que la PKC regula eventos críticos en los eventos de la promoción tumoral y de la carcinogénesis multietapas.

Los estudios anteriormente mencionados, aunque se refieren al TPA como promotor y a su forma de acción, pueden explicar la acción de otros promotores que tienen que ver con la carcinogénesis humana. Por ejemplo, se sabe que ciertos ácidos biliares que están implicados en la carcinogénesis del colon pueden activar a la PKC, translocarla hacia la membrana e inducir la expresión de forbina, una proteína que es inducida por la presencia de PKC y cuya función es aún desconocida (17). No se piensa que todos los promotores actúen directamente activando a la PKC, pero es posible que lo hagan indirectamente mediante la sobreproducción de diacilglicéridos (que son activadores de la PKC) o mediante la modificación de las señales de transducción.

Algunos aspectos importantes acerca de la carcinogénesis aún son desconocidas. Ciertas formas de cáncer humano son debidas a interacciones sinérgicas entre virus específicos los cuales tienen un potencial bajo (o no lo tienen) carcinogénico, y sustancias químicas que tienen una actividad genotóxica (iniciadores) o bien de promoción tumoral.

Existen sustancias que pueden actuar como iniciadores y promotores simultáneamente en el proceso de la carcinogénesis, causando efectos fenotípicos e imitando la acción de promotores tumorales.

Aunque se han llevado a cabo estudios donde se describe la manera de acción de la PKC, se conoce realmente muy poco acerca de cómo son llevadas las señales desde el citoplasma hasta el núcleo y así alterar los patrones de la expresión genética.

### 2.1.3 Progresión tumoral

Se sabe muy poco acerca de los eventos moleculares responsables de la progresión tumoral, por ejemplo, la conversión de tumores benignos a tumores malignos (2, 17, 26). Sin embargo, existe evidencia de que el proceso es potenciado por agentes genotóxicos, lo que implica que la progresión debe involucrar daños posteriores al DNA (17).

La amplificación de secuencias específicas de DNA (3, 20) y la inestabilidad del cariotipo (13), parecen jugar un papel importante en la progresión tumoral y la tendencia a malignizar tumores. Peyton Rous en 1939, describe la progresión tumoral como "el proceso por el cual los tumores van de mal en peor".

## 2.2 Oncogenes

Un oncogene es un gene celular o viral que puede inducir una o más características de transformación neoplásica cuando se introduce, solo o en combinación con otro gene, dentro de un tipo de célula apropiada. Los genes celulares normales que por mutación pueden ser convertidos a oncogenes activados son llamados protooncogenes. Estos codifican para componentes de las vías de señales de transducción que juegan un papel importante en el control del crecimiento y de la diferenciación. Inicialmente se pensó que los carcinógenos actuaban modificando los protooncogenes para formar oncogenes activados, y esto llevaba a la anormalidad en el crecimiento y diferenciación celular imitando a las proteínas normales (1).

También se dice que los oncogenes son genes dominantes, cuya función es contrarrestada por otros genes recesivos llamados genes supresores de tumor o antioncogenes. Se presenta la transformación neoplásica sólo cuando se ve alterada su función (33).

No se sabe con exactitud cómo actúan los productos de los oncogenes dentro del proceso neoplásico. Existen dos hipótesis: una de ellas dice que las proteínas derivadas de oncogenes tienen funciones anormales debido a una alteración

en su protooncogene (22).

La segunda hipótesis dice que la transformación neoplásica se da por sobreexpresión de proteínas que desempeñan funciones normales de la célula. Esta sobreproducción de proteínas viene acompañada de la amplificación de ciertos oncogenes que normalmente son silenciosos. Al parecer hay posiciones que son preferidas para la amplificación celular de genes, debido a que estos rearrreglos cromosómicos pueden facilitar la amplificación génica por posicionamiento de secuencias cruciales de DNA en un orden favorable (20).

#### 2.2.1 Estrategias en la caracterización de oncogenes y protooncogenes

Se han desarrollado estrategias para lograr la caracterización y función de oncogenes en la célula transformada y de protooncogenes en la célula normal (34). Se han realizado estudios en genética molecular para establecer las consecuencias de la transferencia de genes mediante las tres técnicas siguientes: 1) A través de la introducción directa de DNA, 2) por la infección con virus vectores de células en cultivo o animales de laboratorio y 3) por la producción de ratones transgénicos. La utilización de técnicas inmunológicas para la producción de anticuerpos en contra de proteínas oncogénicas es otra técnica utilizada

en este tipo de investigaciones y consiste en aislar los genes que codifican para estas proteínas e introducirlos a un virus vector, con el cual se infectará a una gran variedad de células para producirlas en grandes cantidades. Al purificar parcialmente estas proteínas, se pueden inducir anticuerpos específicos en animales. Alternativamente, al conocer la secuencia nucleotídica de la proteína oncogénica, se puede sintetizar en el laboratorio, para ser utilizada como antígeno en ensayos inmunológicos. Por último la realización de experimentos bioquímicos con el objeto de conocer la actividad y la localización de las proteínas ha arrojado luz al conocimiento de los mecanismos implicados en la carcinogénesis. A este respecto se pueden seguir varias estrategias. Una de ellas es utilizar la información previa acerca de la secuencia de proteínas cuya función ya es conocida y compararla con la secuencia de proteínas oncogénicas. Al encontrar cierta homología, se puede sospechar que la actividad de la proteína oncogénica en estudio es similar a la de la proteína conocida. Otro procedimiento que se utiliza consiste en el uso de anticuerpos en combinación con técnicas de fraccionamiento celular para conocer la localización y el tamaño de la proteína oncogénica dentro de la célula.

### 2.2.2 Actividad oncogénica

Los oncogenes pueden ser agrupados en base a las

propiedades estructurales de sus productos. El grupo más grande incluye aquellos con actividad de tirosina cinasa, como son *abl*, *fes/fps*, *fgr*, *ros*, *src* y *yes* o aquellos estructuralmente relacionados con una tirosina cinasa pero que no presentan dicha actividad, tales como *erb B*, *fms*, *raf/mil/mht* y *mos* (25). Este descubrimiento entraña enorme interés pues es sabido que algunas de las proteínas son reguladas mediante fosforilación (1). Una de las proteínas que se fosforilan es la vinculina. Esta proteína se sabe que se encuentra relacionada con la configuración del citoesqueleto y que provoca un cambio en la morfología de las células en cultivo. Otros grupos incluyen al oncogene *sis* cuyo producto está estructuralmente relacionado con un factor de crecimiento; aquellos como la familia *ras* que enlazan guanosina trifosfatasa; aquellos que son proteínas nucleares como *fos*, *myb* y *myc*; y aquellos que se encuentran en el citoplasma como *ets*, *rel*, *ski* y *erb A* que codifica para un receptor de una hormona tiroidea (38).

### 2.3 Genes supresores de tumor

Reciben el nombre de genes supresores de tumor o antioncogenes aquellos genes que inhiben el crecimiento y/o la diferenciación celular y podrían detener la evolución y crecimiento de una masa tumoral (17). La inactivación de estos genes por mutaciones podría desencadenar el desarrollo

de una neoplasia, lo que implica que su función normal es limitar el crecimiento celular (34).

No se conoce aún la función de la mayoría de los genes supresores de tumor, aunque pueden funcionar de alguna de las siguientes maneras:

a) Los productos de esos loci interactúan de una manera antagonista con proteínas de oncogenes y protooncogenes. Por ejemplo la proteína Rb que se une a los productos de las regiones transformantes de SV40 y papillomavirus inhibiendo el desarrollo del tumor.

b) Podrían codificar también para proteínas necesarias en el proceso de la diferenciación y desarrollo del organismo. Lo anterior estaría apoyado en el hecho de que una célula tumoral presenta inhibición de la diferenciación.

c) También es posible que esos genes codifiquen para productos que capaciten a las células a responder a señales que causen inhibición del crecimiento o inducción de la diferenciación, haciendo que la célula prolifere de una manera anormal.

Se han descubierto distintos genes supresores de tumor mediante el análisis cromosómico de células de distintos tipos de tumor donde se encontraba la delección o translocación de ciertos fragmentos cromosómicos y que posiblemente codificaba para un gene supresor de tumor. Existen alrededor de 18 posibles genes, de los cuales los

más estudiados son la proteína Rb de retinoblastoma, el tumor de Wilm que es un cáncer de células embrionarias de riñón, el del cáncer de células renales, el del carcinoma de pulmón de células pequeñas y el del cáncer colorrectal. En este último se han perdido el brazo largo del cromosoma 5, el brazo corto del cromosoma 17 y el 18.

#### 2.4 Mecanismos de invasividad (metástasis)

Uno de los criterios por medio de los cuales se evalúa el pronóstico del paciente que padece de cáncer, es el grado de invasividad que presente el tumor. A menor invasividad mejor pronóstico.

Una de las características de las células neoplásicas es la de invadir el tejido circundante (3). A esta propiedad se la conoce con el nombre de invasividad. Se ha propuesto el siguiente mecanismo mediante el cual la célula puede invadir el tejido circundante y producir metástasis:

- 1.- Desprendimiento de las células invasoras del conglomerado celular del tumor
- 2.- Penetración a través de la matriz extracelular
- 3.- Destrucción de la membrana basal a los vasos sanguíneos
- 4.- Acceso a la luz de esos vasos sanguíneos
- 5.- Viaje por la circulación y su alojamiento en otro sitio de la microcirculación mediante la adherencia de los vasos capilares

- 6.- Nuevamente la ruptura de la membrana basal
- 7.- La invasión del tejido extracelular circundante
- 8.- Crecimiento en el nuevo microambiente.

Al proceso anterior se le conoce como cascada metastásica y deben distinguirse dos fases fundamentales: una la de la invasión propiamente dicha y la otra la del depósito de estas células en el tejido blanco donde crecerán en forma independiente (13, 8, 12).

Evidencia experimental sugiere que el fenotipo metastásico es hereditario y altamente conservado en la evolución y puede ser conferido a una célula no metastásica mediante transferencia genómica del DNA (35).

Las clonas individuales provenientes de un mismo tumor primario difieren en su capacidad metastásica, por lo que se les considera heterogéneas en su comportamiento metastásico, teniendo cada una de ellas especificidad para el órgano que metastatizan debido posiblemente a la presencia de receptores (13).

La capacidad migratoria de la célula depende de sus propiedades intrínsecas y de las condiciones generales del individuo.

En cuanto a sus propiedades intrínsecas éstas se refieren a tres grupos de enzimas involucradas en la destrucción del tejido, como colagenasas, serinoproteasas y las tiolproteinasas. Disuelven la membrana basal y fibras de colágeno en el tejido conectivo que obstruye su proceso de invasión.

Las alteraciones que se presentan en la superficie de la célula tumoral pueden afectar su adhesión a otras células, funcionalidad de los receptores y promover el desprendimiento del tejido.

Acerca de los factores extrínsecos se dice que la metástasis resulta de anormalidades adquiridas en la regulación de un gene en las células tumorales, pero que pueden ser modificadas o inhibidas por condiciones locales o sistémicas en el huésped (algunas células normales del huésped pueden inhibir o favorecer la formación secundaria de tumores) (34).

Virtualmente todas las características fenotípicas de las células de un tumor dado resulta de la activación inapropiada de genes que normalmente sólo son expresadas en otras células del mismo organismo o en otros estados de su desarrollo. Se supone que esta expresión inapropiada de genes normalmente silenciosos en la mayoría de las células es responsable del comportamiento metastásico.

## 2.5 Factores de crecimiento y receptores hormonales

Los factores de crecimiento son mensajeros polipeptídicos que afectan al crecimiento y la diferenciación de un tipo específico de células animales, tanto en organismos en desarrollo como en cultivos de tejidos (3).

Se sabe que en distintos tipos de cáncer responden a la influencia de hormonas debido a que la célula sintetiza cantidades exageradas de receptores para estas hormonas. Un ejemplo claro de esto es el cáncer de mama, ya que se ha demostrado que sintetiza receptores para estrógenos y progestágenos (13).

La proliferación de células en cultivo es regulada por factores de crecimiento de naturaleza polipeptídica (21). Hasta el momento se conocen los siguientes: El factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Cuando se añade cualquiera de éstos a un cultivo de células que no se estén dividiendo promueve la división una sola vez (3, 1, 13).

Los factores de crecimiento actúan mandando su señal unidos a receptores específicos en la membrana plásmática. La molécula receptora posee una función doble: se une al

factor de crecimiento y fosforila la tirosina de proteínas celulares. El receptor es una proteína que atraviesa la membrana; la parte que queda en el exterior reconoce al factor, y la región catalítica situada en el interior de la célula es el lugar donde se realiza la fosforilación. La unión con el factor debe transmitir una señal, a través de la membrana, que incrementa la actividad de cinasa de la región catalítica.

Se han encontrado ciertas homologías entre productos de oncogenes y algunos factores de crecimiento. La PDGF humana tiene homología con el producto de v-sis. El receptor de EGF presenta homología con v-erb-B. Recientemente, la proteína de c-fms ha sido identificada como receptor para el factor de crecimiento de células mieloides, el factor 1 estimulante de colonias.

Hay tres sitios en las vías de control del crecimiento en las cuales las proteínas de oncogenes pueden influir en el crecimiento del tumor (21)

- 1.- La proteína puede imitar un factor de crecimiento y unirse a los receptores
- 2.- La proteína oncogénica puede funcionar mandando señales equivalentes a un receptor asociado a un factor de crecimiento
- 3.- La proteína oncogénica puede actuar en una vía intracelular de control del crecimiento desacoplándolo de la

necesidad de un estímulo exógeno. Los oncogenes relacionados con vías de crecimiento a nivel de postreceptor, son la familia src, yes, fgr, fps/fes, ros y abl, cuya actividad es de tirosina cinasa. Actúan fosforilando proteínas que contienen tirosina, dando de esta manera un estímulo mitogénico continuo.

Las proteínas de ras pueden transducir señales desde los receptores de la superficie celular mediante la regulación de la adenilatociclasa y aumentar los niveles de AMPc (3, 17).

Quizá algunas cinasas determinadas por muchos oncogenes usurpen algún mecanismo de control del crecimiento, fosforilando alguna proteína que normalmente es reconocida por la cinasa de un receptor, promoviendo la división de la célula infectada.

## 2.6 Marcadores tumorales

La células cancerosas representan células con distintos grados de diferenciación. Algunas de éstas pueden expresar proteínas que son características de las células embrionarias o fetales. A estas proteínas se les llaman productos o antígenos oncofetales, ya que deben estar suprimidas en una célula normal.

De los antígenos oncofetales más estudiados tenemos la alfa-feto proteína, el antígeno carcinoembrionario (CEA), la fracción beta de la gonadotropina coriónica, la beta-2-microglobulina, algunas isoenzimas de la fosfatasa alcalina como la isoenzima P o Regan y las isoenzimas 4 y 5 de la deshidrogenasa láctica (13).

La expresión de la alfa feto proteína se encuentra relacionada con los cánceres del hígado y algunos tumores gonadales de testículo y ovario.(13)

Se ha estudiado exhaustivamente el antígeno carcinoembrionario (CEA) como un marcador del cáncer colorrectal, aunque hasta la fecha no ha resultado ser tan sensible al tratarse de un diagnóstico precoz. Los pacientes que presentan altos niveles del CEA se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad. Por otra parte se pueden encontrar niveles altos en otras enfermedades benignas. Al parecer no se encuentra relación entre la expresión del antígeno y los factores de riesgo relacionados con el carcinoma (13, 4).

La isoenzima de la fosfatasa alcalina llamada P o Regan se expresa en tumores de diferente estirpe y el aumento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y deshidrogenasa láctica, ambas enzimas de la vía glucolítica, hablan del predominio de la glucólisis anaerobia en tejidos

neoplásicos.

A pesar de los esfuerzos realizados, no se ha podido encontrar un marcador universal del cáncer que permita de una manera fácil y rápida identificar de manera general la presencia de cáncer en líquidos corporales o tejidos de un individuo.

### 2.7 Antígenos tumorales

Son moléculas que se expresan en las células tumorales como resultado de la alteración causada por el agente carcinógeno, las cuales son reconocidas como extrañas para el sistema inmune (39).

Existen tres tipos de antígenos (13):

- 1.- Los antígenos clase I. Son propios de un solo tumor y no se encuentran en ningún otro tejido.
- 2.- Los antígenos clase II. Están presentes en tumores de distintos individuos y ocasionalmente en tejidos sanos.
- 3.- Los antígenos clase III. Se encuentran ampliamente distribuidos en tejido tumoral y en tejido sano.

### III. Tumores benignos de colon

En lo que respecta al colon tiene dos funciones principales: absorción de agua y electrolitos a partir del quimo y el almacenamiento de materia fecal hasta que pueda

expulsarse al exterior. La primera mitad del colon es de absorción principalmente y la mitad distal tiene que ver con el almacenamiento, por lo que sus movimientos son bastante lentos (18). Esto hace que los carcinógenos presentes en los alimentos tengan mayor contacto con la mucosa intestinal. A este respecto se ha mencionado que el efecto de la fibra en la dieta es el de proteger, al igual que una barrera física, de las sustancias que favorezcan el desarrollo del cáncer colorrectal. Lo anterior se explicará más ampliamente en el punto 5.2.

Los pólipos o tumores benignos de colon se definen como masas visibles de tejido que protuyen hacia la luz del conducto gastrointestinal, independientemente de su tamaño, forma o tipo histológico (4).

Se les llama pólipos debido a que se proyectan hacia la luz intestinal. Existen distintos tipos histológicos de pólipos y se pueden dividir con base en su grado de agresividad, siendo neoplásicas o no neoplásicas. Los pólipos no neoplásicos comprenden pólipos hiperplásicos, inflamatorios, juveniles y hamartomas. Los pólipos neoplásicos pueden ser benignos (pólipo adenomatoso) o malignos (carcinoma polipoide). Los no neoplásicos son más frecuentes, pero los neoplásicos causan mayor morbilidad y mortalidad.

Algunos tipos histológicos de pólipos carecen de consecuencias clínicas y otros pueden producir síntomas, más sin embargo esto no implica riesgo de transformación maligna.

### 3.1 Clasificación de tumores polipoides de colon

A continuación se expone brevemente la clasificación de los tumores polipoides del colon (4):

#### I. Tumores epiteliales

##### A. Hiperplásicos

##### B. Adenomas

##### C. Adenomatosis

#### II. Tumores no epiteliales

##### A. Tumores de músculo liso (leiomias)

##### B. Tumores vasculares

##### C. Lipomas

#### III. Hamartomas

##### A. Pólipos y poliposis de Peutz-Jeghers

##### B. Pólipos y poliposis juvenil

##### C. Neurofibromas y ganglioneuromas

#### IV. Tumores inflamatorios o reactivos

##### A. Pseudopólipos inflamatorios

## B. Pólipos linfoides

## C. Granulomas polipoideos y de barío

## V. Tumores mixtos

De todos los tipos de pólipos anteriores unicamente se acepta que los adenomas tengan cierta tendencia a malignizarse (aproximadamente sólo el 1% lo hacen), ya que experimentan cambios bioquímicos que se pueden observar en la célula neoplásica. Existe evidencia experimental del paso de adenoma a adenocarcinoma, pero hay que tomarla con reserva, ya que fue lograda en cultivos celulares (2). No se tienen datos en México de la incidencia de estos pólipos.

Existe evidencia experimental de que los pólipos pueden ser precursores de carcinomas de intestino grueso (11). Los autores realizan electroforesis bidimensionales de tejido de pólipos y adenocarcinomas y encuentran que los patrones proteicos son muy semejantes entre sí, siendo a su vez éstos diferentes a aquellos mostrados en los tejidos normales. No todos los adenomas se transforman en cáncer, ya que existe alta incidencia de pólipos sobre los casos de cáncer detectados.

Se ha demostrado que existen cambios bioquímicos en los adenocarcinomas, como el aumento de la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, piruvato cinasa y lactato

deshidrogenasa. Estos cambios pueden presentarse en algunos pólipos, pero no en tejido sano, lo que aporta más evidencia de la predisposición a la malignización del tejido (11).

### 3.2 Frecuencia y distribución

En los pólipos de colon existe cierta prevalencia en personas que han sobrepasado la edad de 30 años. La coincidencia de que también en el cáncer de colon se vea este aumento a la edad de 30 años, es una de las razones por las cuales se acepta que los pólipos y en especial los adenomas, sean considerados como estado preneoplásico, es decir con riesgo a malignizarse.

Este tipo de lesiones son más frecuentes en el hombre que en la mujer (4).

Para establecer la localización del pólipo dentro del cuerpo del paciente, se han hecho estudios de necropsia y se ha podido comprobar que aproximadamente el 20% de los pólipos del intestino grueso se localizan en el recto, 30% en el sigmoide y el colon descendente, el 20% en el colon transversal y el 30% en el ciego y en colon ascendente. La importancia de conocer el porcentaje de la localización de los pólipos en el intestino se deriva del método adecuado de diagnóstico que sea utilizado, ya que de no ser así, podría pasar desapercibido algún tumor benigno que no estuviera

dentro de los límites aceptados en la eficacia del método.

### 3.3 Etiología

La etiología de los pólipos benignos de colon varía según el tipo de pólipo. Debido a que los factores sobre la etiología son comunes a los de los tumores malignos, se tratarán más detenidamente en el tema correspondiente.

#### IV. Tumores malignos de colon y recto

El desarrollo de tumores malignos no representa solamente el desarrollo y proliferación de células neoplásicas, sino también la falla del mecanismo inmunológico del individuo para eliminar células aberrantes. Para llevarse a cabo una vigilancia inmunológica efectiva es necesario contar no solamente con un huésped inmunocompetente sino también con la expresión de moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que acompañan a los antígenos propios del tumor (neoantígenos).

Los tumores malignos de colon y de recto se pueden clasificar en primarios y metastásicos. Los tumores malignos primarios son los que se originan del colon y del recto. Los metastásicos son aquellos que afectan estos sitios provenientes de lugares distantes o bien que lo afectan como

consecuencia de un proceso de diseminación (4).

#### 4.1 Anatomía patológica

El cáncer colorrectal se disemina por extensión directa, ya sea infiltrando diferentes capas del intestino o bien en sentido longitudinal. Las vías que puede utilizar para su diseminación son la vía linfática, vascular y por siembras tumorales durante la operación a la que podría ser sometido el paciente. El órgano que es más común de metástasis a distancia es el hígado, siguiendo en frecuencia el pulmón y los huesos (40).

##### 4.1.1 Rasgos macroscópicos

El adenocarcinoma puede tomar una de estas cuatro configuraciones macroscópicas: exofítico, ulceroso, infiltrativo o anular. La localización rara vez modifica el tipo de configuración y además tiene que ver con el pronóstico de la enfermedad.

##### 4.1.2 Rasgos microscópicos

Los rasgos histológicos que se relacionan con el pronóstico incluyen el grado de diferenciación, el grado de afectación de los ganglios linfáticos, las características de las márgenes principales del tumor, la infiltración

linfática, venosa o perinuclear, la presencia de inflamación en la zona, la afectación de los órganos vecinos, etc.

Los rasgos anteriores (excepto el grado de diferenciación) se consideran parámetros para la clasificación de Duke en el cáncer colorrectal (36). En la etapa A el tumor está limitado a la mucosa y submucosa. En la etapa B se encuentra diseminado a la capa muscular o serosa. La etapa C corresponde a la diseminación a ganglios linfáticos regionales. Por último, en la etapa D ya existen metástasis lejanas.

En la población de la Ciudad de México, en 1988 se tuvieron un total de 387 casos de cáncer de colon, correspondiendo 3 casos a la extensión clínica in situ (Etapa A), 209 casos a localizado (Etapa B), 93 casos a metástasis regional (Etapa C), 46 casos a diseminado (Etapa D) y en 36 casos no se determinó o no se pudo recopilar la información adecuada (28). Entre menor invasividad y metástasis presente el tumor será mayor la sobrevida del paciente (19).

#### 4.1.3 Tipos histológicos

Los grados de diferenciación del tumor son una herramienta muy útil para el patólogo cuando es usado como

un indicador pronóstico. Existen varios sistemas, como el de numeración (de 1 a 3 ó 4), la clasificación de Broders, o de una serie de términos descriptivos como "bien diferenciado", "moderadamente diferenciado", "poco diferenciado" e "indiferenciado o "anaplásico". Este último es el utilizado en el presente trabajo, por los que se explicará más ampliamente lo que involucra cada uno de ellos (4).

Los tumores bien diferenciados son aquellos que están formados en su mayoría por estructuras glandulares provistas de núcleos que presentan una polaridad y una orientación basal.

Los moderadamente diferenciados son predominantemente glandulares, aunque presenten una pequeña pérdida de la polaridad y la orientación nuclear.

Los tumores poco diferenciados se caracterizan porque su tendencia a formar láminas y nidos predomina sobre la formación de elementos glandulares.

Un tumor indiferenciado es aquel que no presenta elementos glandulares. Existen variantes de este tipo de tumor como el carcinoma de células de anillo de sello o el carcinoma mucinoso. Este tipo de tumores presentan un pronóstico bastante malo, debido a que cuando la mucina ocupa el 60% del volumen total del tumor, la sobrevida del

individuo a los 5 años es de 31 al 74%. El papel de la mucina todavía no está bien establecido, pero se piensa que tiene que ver con la separación de los planos tisulares, y una alteración de la integridad vascular y del glucocáliz tumoral, facilitando así el proceso de metástasis y alterando la barrera inmunológica.

En el Registro Nacional de Cáncer de 1988 se tienen registrados los tipos histológicos considerados en el cáncer colorrectal. El más frecuente es el adenocarcinoma SAI que representa el 79.6% del total, siguiéndole el adenocarcinoma secretante de mucina con 4.7% y el adenocarcinoma mucinoso con 4.1%.

El contenido de DNA de las células tumorales refleja mejor el grado de malignidad del tumor y se relaciona así con el pronóstico. Si éste es aneuploide o heteroploide se asocia con un pronóstico poco favorable. El contenido de RNA también puede ser interpretado de la misma manera.

#### 4.2 Alteraciones cromosómicas y proteínas oncogénicas en cáncer colorrectal

Para entender los cambios que sufre la célula en la carcinogénesis se requiere del análisis de la expresión metabólica de los tumores que provengan de las diferentes etapas de la progresión tumoral.

Análisis citogenéticos han demostrado deleciones del brazo corto del cromosoma 17 en casi el 75% de los tumores analizados. Otros investigadores han demostrado deleciones en el brazo largo del cromosoma 5 en el 40% de los adenocarcinomas analizados. Pueden o no mostrar la pérdida simultáneamente. Más recientemente se ha encontrado pérdida del brazo largo del cromosoma 18 y alteraciones del cromosoma 11 (5). También se ha demostrado la activación del gené c-Ki-ras (generalmente por mutación puntual en el codón 12) (5). El gené ras también se puede encontrar activado en las lesiones premalignas, por lo que se piensa que pueda estar involucrado con la hiperplasia benigna, la pérdida de la heterocigocidad alélica en uno o más cromosomas, contribuyendo así al desarrollo del tumor (33).

En general, la expresión aumentada de un oncogene parece ser necesaria para el crecimiento incontrolado de la célula tumoral. La proteína correspondiente también se encuentra aumentada (20). En cáncer colorrectal se han encontrado alterados los siguientes oncogenes: c-myb, c-myc (31), familia ras, src, fyn y yes.

El oncogene ras se encontró expresado en el 40% de los tumores analizados (24), siendo su mecanismo de acción y relevancia desconocidos. La proteína de ras puede transducir señales desde los receptores de superficie celular mediante

regulación de la adenilato ciclasa y subir los niveles de AMPc (21). El producto de ras corresponde a una proteína de peso molecular de 21 kD.

El análisis del oncogene myc aumentó alrededor de 30 copias, al igual que myb. Las proteínas correspondientes también pueden ser encontradas en altas concentraciones. El producto de myc puede encontrarse unido a otras proteínas. Por ejemplo, puede asociarse formando una proteína de fusión gag-myc de 110 kD, o en una poliproteína de 200 kD gag-pol-myc, así como también puede encontrarse sola siendo una proteína de 58 a 63 kD. El producto de myb puede encontrarse como una proteína aislada de 48 kD, o bien como proteína de fusión de 130 kD (25). Estos oncogenes al ser nucleares, se cree que regulan la expresión de otros genes necesarios para la respuesta mitótica (21).

La proteína de src de peso molecular de 60 kD actúa de manera similar que los factores de crecimiento conocidos, fosforilando a la tirosina y estimulando el crecimiento celular.

Aunque existe la especificidad de la sobreexpresión de una oncoproteína en su correspondiente tipo de cáncer, hay que hacer notar que los oncogenes alterados, no son exclusivos del cáncer colorrectal. Por ejemplo en el cáncer

de mama, está comprobada la sobreexpresión de la proteína de myc.

#### 4.3 Etiología

La adopción de regímenes alimenticios altos en fibra reduce el tiempo de tránsito intestinal, por lo que cualquier carcinógeno permanece durante menos tiempo en contacto con la mucosa intestinal.

Estudios epidemiológicos han sugerido que diversos cánceres como el de colon, mama, páncreas y próstata están asociados con la dieta alta en carne y grasa y baja en fibra y cereales.

En países desarrollados el adenocarcinoma de colon es más prevalente, especialmente en Norteamérica y Europa (16, 19, 37). Sin embargo se puede observar lo contrario en países como Sudamérica, Asia y África donde las tasas de cáncer colorrectal son más bajas. Por lo anterior se acepta de manera general, que la dieta es el principal factor etiológico siendo altas en grasa y bajas en fibras características de los países del primer mundo y altas en fibras y bajas en grasa en el tercer mundo. Aunque hasta la fecha no se sabe con exactitud cual es el papel de ambos factores en la carcinogénesis del cáncer colorrectal, se

piensa que se trata de un proceso complejo en el cual se interrelacionan de alguna manera ambos factores (7).

Existen cinco hipótesis que tratan de explicar el papel de los carcinógenos iniciadores y promotores en el proceso de carcinogénesis. Actualmente se comprueban con datos de laboratorio, epidemiológicos y clínicos (5).

Fecapentanos: Pertenecen al grupo de los éteres de glicerol y alcoholes insaturados conteniendo 5 dobles enlaces conjugados. Estos agentes mutagénicos se forman en el lumen del colon. Su precursor se desconoce pero se sabe que son producidos por algunas cepas de Bacteroides.

3-cetosteroides: Estos esteroides citotóxicos y genotóxicos actúan como iniciadores y promotores en el epitelio del colon. Su concentración en las heces varía enormemente posiblemente debido a la cantidad formada a partir del colesterol presente en la comida como en el lumen del colon.

Productos de pirólisis de comida: Alimentos que se calientan arriba de 100 C contienen productos de pirólisis los cuales actúan como iniciadores.

Deficiencia de calcio: Se conoce que los ácidos biliares son promotores en el cáncer de colon. En dietas altas en grasas, se observa movilización de ácidos biliares que son

requeridos para su solubilización y es por esto que se le asocia al consumo de grasa con el cáncer de colon. El consumo de calcio en la dieta reduce el efecto de los ácidos biliares ya que probablemente precipite a éstos como sus sales, reduciendo así la concentración de los ácidos biliares libres en solución en el colon y recto.

La pérdida de células epiteliales llevan a incrementar su proliferación y a incrementar su sensibilidad a carcinógenos. Se asume que los promotores de carcinogénesis pueden inducir proliferación celular.

pH fecal alto: En dietas altas en grasas y proteínas y bajas en fibras, el pH fecal llega a alcalinizarse. Esto afecta a la solubilidad de los ácidos biliares siendo mayor a pH alto lo que lleva a tener en solución una mayor concentración libre que pueda dañar el epitelio.

El planteamiento que se ha usado para probar las hipótesis en el origen del cáncer de colon involucra dos pasos: a) el uso de ensayos biológicos para definir los posibles factores carcinogénicos y b) la prueba de la importancia de estos factores. En a, en el medio ambiente se buscan agentes carcinógenos involucrados y se formula una hipótesis. En b, se prueba la hipótesis para ver qué tanto explica la enfermedad.

Para buscar los posibles carcinógenos se usaron tres métodos: análisis mutacional y un ensayo de aberraciones nucleares para posibles agentes iniciadores y de proliferación del epitelio del colon para posibles promotores. Es necesario realizar mayor número de ensayos específicos para definir aquellos factores carcinogénicos

Para establecer la validez de la hipótesis de los agentes etiológicos, se usaron los tres criterios siguientes: a) Probar si el posible carcinógeno puede inducir o promover el cáncer en animales. b) Probar si el agente está asociado con la enfermedad en humanos en estudios epidemiológicos, c) Probar si eliminando el agente del medio ambiente se puede disminuir la incidencia de la enfermedad.

Se ha hablado de que las bebidas alcohólicas, especialmente la cerveza, tienen relación con la aparición del cáncer de colon y recto. Aunque todavía no está claro su efecto se cree que tiene que ver con la modificación de la flora fecal o bien con la concentración de esteroides fecales (4).

Existen algunas pruebas de que el retinol y los carotenos ejercen un efecto protector contra el cáncer, incluido el colorrectal, así como también presentan este efecto el ácido ascórbico y el selenio (4).

#### 4.4 Epidemiología

Gracias a los estudios epidemiológicos que se han realizado en el tema del cáncer de colon y recto se han logrado correlacionar las posibles causas de este tipo de cáncer y se ha podido establecer la edad promedio en la cual es más frecuente, el sexo más afectado, los factores de riesgo, etc.

##### 4.4.1 Distribución por grupos de edad

En estudios realizados en la población de Estados Unidos el riesgo de que se manifieste un cáncer colorrectal comienza de los 40 a los 50 años, alcanzando su punto máximo entre los 75 y los 80 años. En la Ciudad de México existen datos epidemiológicos de la distribución por grupos de edad que muestran que en los 387 casos de cáncer de colon registrados en 1988, la edad en que puede empezar a manifestarse comienza entre los 15 y 19 años con tendencia al aumento en la frecuencia de aproximadamente 5 veces entre los 40 y los 44 años, teniendo un pico entre los 60 y los 64 años (28).

Generalmente se considera que el cáncer que aparece en los pacientes de menos de 30 años es agresivo (4).

#### 4.4.2 Distribución del cáncer de colon por sexo

En el año de 1988 se detectaron 17,860 casos de cáncer en 51 unidades hospitalarias del sector público (SSA), privado y asegurado (IMMS, ISSSTE, Militar, Naval y H. Pemex) de la Ciudad de México, siendo el 37% correspondiente a hombres y el 63% a mujeres. Dentro de éstos, se registró una incidencia del 2.17% en cáncer de colon (50.13% hombres y 49.61% mujeres) y del 1.55% en cáncer de recto-ano (50.54% hombres y 49.1% mujeres). (Tabla B y C) (28).

De acuerdo a los datos obtenidos existe una tendencia del sexo masculino a padecer cáncer de colon y de recto, aunque la diferencia parece no ser significativa.

Dentro de la tabla de incidencias de cáncer en hombres y en mujeres el de colon ocupa el XII lugar, no así el de recto-ano que se encuentra en el XV lugar en hombres y XVI lugar en mujeres. Se necesitarían hacer seguimientos de casos, así como de estudios en grupos controles para poner en claro los diversos factores predisponentes y la relación que hay entre la frecuencia de estos tipos de cáncer y el sexo.

#### 4.5 Factores de riesgo

##### 4.5.1 Cáncer colorrectal previo

Los pacientes que ya han padecido un cáncer son propensos a padecer otro, aunque el primero haya sanado.

#### 4.5.2 Adenomas colorrectales esporádicos aislados y múltiples

Los adenomas colorrectales se pueden relacionar con la aparición de un adenocarcinoma. La observación de las características de crecimiento de los adenocarcinomas de colon sugiere que la mayoría de ellos proceden de adenomas previos (4).

#### 4.5.3 Enfermedad inflamatoria intestinal

La colitis ulcerosa de larga evolución es otro factor de riesgo, que parece depender de dos factores: la duración de la colitis activa y la extensión de los cambios inflamatorios en el colon.

#### 4.5.4 Síndromes hereditarios de poliposis

Dentro de los síndromes hereditarios de poliposis el más importante y el que se discutirá será el de la poliposis familiar. Se caracteriza por la aparición de pólipos adenomatosos en el colon y recto. Todos los individuos de la familia acaban padeciendo este tipo de cáncer, por lo que se considera de gran importancia el estudio de este tipo de síndrome.

#### 4.6 Manifestaciones clínicas del cáncer colorrectal

Los cánceres de recto y de colon crecen y obstruyen, se ulceran y sangran, invaden estructuras vecinas, producen dolor y con menor frecuencia horadan los órganos vecinos o la cavidad peritoneal.

Los rasgos clínicos dependen de las características del crecimiento del tumor y de su localización en el interior del colon.

La rectorragia es un síntoma que aparece con mayor frecuencia en los cánceres del lado izquierdo del colon y del recto. En los cánceres de colon derecho la sangre no es tan evidente por lo que generalmente es difícil detectarla. Estos pacientes sufren de anemia progresiva. Cuando el sangrado es más abundante puede dar lugar a la evacuación de heces de color marrón rojizo.

Los cánceres localizados en el ciego y en el colon derecho no producen obstrucción hasta que crecen y presentan un tamaño considerable, debido a que son secciones distensibles y más voluminosos y además el contenido intestinal es líquido. Los cánceres de colon ascendente pueden bloquear la luz intestinal con más facilidad.

En el colon izquierdo, donde la luz intestinal es más estrecha y menos distensible y la materia fecal tienen una consistencia sólida, es frecuente que el cáncer obstruya su paso. Los principales síntomas que se presentan son estreñimiento y dolores abdominales espasmódicos.

Es característico de los cánceres rectales la aparición de tenesmo rectal, necesidad urgente de defecar, pequeñas hemorragias de color rojo brillante, cambios en el calibre de las deposiciones e incontinencia. La invasión local puede ser el origen del dolor perianal, de la hematuria, del tenesmo urinario y de las fistulas vaginales.

La perforación que el cáncer de colon puede producir en la cavidad peritoneal puede formar un absceso localizado. Esto puede provocar sepsis intermitentes. Generalmente se observan signos de irritación peritoneal localizada y dolor abdominal.

La anorexia y la pérdida de peso se presentan frecuentemente en los casos del cáncer de colon avanzado. La debilidad y el malestar se pueden asociar con la anemia, pero también puede deberse a la presencia de metástasis. Los síntomas de la metástasis dependen del lugar que haya invadido. Así cuando el cáncer ha invadido el peritoneo o el retroperitoneo puede producirse dolor localizado abdominal o de espalda. Cuando el tumor se disemina dentro del abdomen

provoca ascitis y la obstrucción intestinal o del ileo. Cuando hay metástasis a hígado hay dolor en el hipocondrio derecho, se observa la presencia de una masa o de ictericia. Las metástasis pulmonares suelen ocasionar tos y disnea.

#### 4.7 Diagnóstico

Si tomamos en consideración que el proceso de la carcinogénesis toma alrededor de 20 años en manifestarse, en humanos, la perspectiva de un diagnóstico certero en etapas iniciales de la transformación maligna es importante para lograr la interrupción de la secuencia adenoma-cáncer (2). La práctica de las pruebas de diagnóstico de cáncer de colon deben realizarse para confirmar o descartar la posibilidad de que exista un adenoma o bien un cáncer colorrectal y así seleccionar la terapia correspondiente.

El diagnóstico de cáncer de colon y de recto debe realizarse tomando en cuenta los datos de la historia clínica del paciente, para evitar que pueda ser confundido con cualquier otro tipo de enfermedad.

Se mencionarán brevemente las estrategias para establecer el diagnóstico (4, 19):

##### 1. Examen físico

El tacto rectal es un examen físico que debe realizarse.

## 2. Sangre oculta en heces

La prueba de la sangre oculta en heces sirve como indicador precoz de un trastorno maligno gastrointestinal. Se realiza utilizando el compuesto llamado guayaco. La prueba se basa en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina produciendo una coloración azul característica por oxidación fenólica del guayaco (4).

## 3. Proctosigmoidoscopia

La proctosigmoidoscopia es una técnica que permite examinar los 25 cm distales del colon, donde aparecen el 50% de las lesiones neoplásicas colorrectales.

## 4. Biopsia y citología

Poseen gran valor diagnóstico si se combinan con la exámenes anteriores. Se utilizan para evaluar el potencial maligno o premaligno de la muestra del paciente, o para señalar la presencia de una displasia.

## 5. Pruebas bioquímicas

Actualmente existe un método de laboratorio a través del cual se puede hacer la detección cuantitativa de células

de colon malignas y potencialmente malignas. La prueba detecta la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en un estudio histoquímico usando una sal de tetrazolium (neotetrazolium) en atmósfera de oxígeno puro, dando reacción positiva sólo aquellas células malignas después de 5 minutos. La importancia de esta prueba está basada en la evidencia de que la célula tumoral experimenta cambios bioquímicos mucho antes de que se manifieste alguna alteración morfológica (8).

#### 4.8 Prevención

Debido a la alta incidencia del cáncer colorrectal y a la morbilidad y mortalidad que se presenta en México, es muy importante detectar el cáncer en los primeros estadios de su evolución o bien prevenirlo.

La prevención primaria es aquella en la cual se tratan de erradicar los factores, genéticos o ambientales, que puedan ser responsables del cáncer colorrectal. La prevención secundaria es aquella en la que se detecta el cáncer antes de que se encuentre avanzado, además de eliminar cualquier factor que pueda predisponer a la malignización del tejido (4, 8).

Los conocimientos que se tienen actualmente en el área del cáncer, nos sirven de marco teórico para comprender lo

complejo de tema, permitiendo plantear nuevas estrategias en el diseño de futuras investigaciones.

En el presente trabajo se estudió la expresión de proteínas en distintos grados de diferenciación, con el objeto de obtener información acerca de las alteraciones que sufre la célula en el estado neoplásico, y la posibilidad de obtener marcadores tumorales en cáncer de colon.

## Materiales y aparatos de laboratorio

### I. Reactivos para la determinación de proteínas

Carbonato de sodio	J.T. Baker
Tartrato de sodio	J.T. Baker
Sulfato de cobre	J.T. Baker
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma

### II. Reactivos para electroforesis bidimensional

Anfolinas Bio-Lyte 3/10	Bio-Rad
Bio-Lyte 5/7	Bio-Rad
2-mercaptoetanol	Bio-Rad
N,N'-metilen-bis-acrilamida	Sigma
Agarosa	Seakem
Acrilamida	Sigma
Persulfato de amonio	J.T. Baker
Glicina	Aldrich Chemical Company
Glicerina	Merck
Nonidet P-40	
Dodecilsulfato de sodio	Bio-Rad
Urea	J. T Baker
Tris base	Sigma
Tris-Ac. clorhidrico	Sigma
Acido ortofosfórico	Merck
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	Sigma

Marcadores de peso molecular                      Sigma

    Alto peso molecular                      Da

Anhidrasa Carbonica                      29,000

Ovalbúmina                                  45,000

Albúmina bovina plasmática              66,000

Fosforilasa B                              97,400

Beta-galactosidasa                      116,000

Miosina                                      205,000

    Bajo peso molecular

Albúmina bovina                            66,000

Ovalbúmina                                  45,000

Gliceraldehido 3-Fosfato

deshidrogenasa                            36,000

Anhidrasa carbónica                      29,000

Tripsinógeno                               24,000

Inhibidor de tripsina                      20,100

Alfa-lactalbúmina                        14,200

Azul de bromofenol                      Merck

Hidróxido de sodio en lentejas           Merck

Inhibidores de proteasas

    Pepstatin A                              Sigma

    Benzamidina                              Sigma

DNasa y RNasa

Alcohol isopropilico                      J.T. Baker

### III. Reactivos para la tinción con plata

Carbonato de sodio anhidro	J.T. Baker
Cloruro cúprico	J.T. Baker
Formaldehido	J.T. Baker
Nitrato de plata	Quimica Barsa
Permanganato de potasio	Merck
Metanol absoluto	J.T. Baker
Acido acético glacial	Merck
Alcohol etilico	J.T. Baker

### IV. Aparatos de laboratorio

Fuente de poder Mod. EPS 500/400. Pharmacia Fine Chemicals

Espectrofotómetro GBC UV/VIS 911

Balanza analitica Oertling mod. NA164

Aparato para isoelectroenfoque de HSI (Hoefer Scientific Instruments) mod. GT 2

Aparato de electroforesis vertical elaborado en el Centro de Instrumentos, UNAM.

## Preparación de reactivos

## I. Electroforesis bidimensional

## Solución A) Amortiguador de lisis

Urea 9.5 mol/L  
NP-40 2% (P/V)  
Anfolinas 1.6 % pH 5-7  
Anfolinas 0.4 % pH 3-10  
Beta-mercaptoetanol 5%  
H2O destilada

## Solución B) Amortiguador de desintegración por ultrasonido

Tris-HCl 0.01mol/L pH 7.4  
MgCl2 5mmol/L  
RNasa Pancreática 50 ug/ml  
H2O destilada

## Solución C) DNasa pancreática

Tris-HCl 0.01mol/L pH 7.4  
MgCl2 1mmol/L  
DNasa Pancreática 1 ug/ml  
H2O destilada

## Solución D) Acrilamida 30%

28.38 % acrilamida  
1.62 % bis-acrilamida  
H2O destilada

Solución E) Solución Nonidet P-40

NP-40 10% (P/V) en H<sub>2</sub>O destilada

Solución F) Anfólinas

Soluciones 40% (P/V)

Solución G) Persulfato de amonio 10% en H<sub>2</sub>O destilada

Solución H) Urea 8mol/L en H<sub>2</sub>O destilada

Solución I) Soluciones electrodo

Solución ánodo

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.01mol/L

Solución cátodo

NaOH 0.02mol/L

H<sub>2</sub>O destilada

Solución K)

Urea 9 mol/L

Anfólinas 1%

0.8% rango de pH 5-7

0.2% pH 3-10

H<sub>2</sub>O destilada

Solución L) Amortiguador del bajo gel

Tris-HCl 1.5mol/L pH 8.8

SDS 0.4%

**Solución M) Amortiguador del sobregel**

Tris-HCl 0.5mol/L pH 6.8

SDS 0.4%

H2O destilada

**Solución N) Acrilamida 30% para geles SDS**

Acrilamida 29.2% (P/V)

Bis-acrilamida 0.8%

H2O destilada

**Solución O) Amortiguador para la muestra-SDS**

Glicerol 10% (P/V)

Beta-mercaptoetanol 5% (v/v)

SDS 2.3% (P/V)

Tris-HCl 0.0625mol/L pH 6.8

H2O destilada

**Solución P) Gel de agarosa**

Agarosa 1% en amortiguador para la muestra-SDS

**Solución Q) Amortiguador para la corrida I**

Tris-base 0.025mol/L

Glicina 0.192mol/L

SDS 0.1%

**Solución R) Amortiguador para la corrida II**

Tris base 0.025mol/L

Glicina 0.192mol/L

SDS 2%

Solución S) Azul de bromofenol

Azul de bromofenol 0.1%

## II. Inhibidores de proteasas (11)

1.- Se disuelve 1 mg de Pepstatin A en 1.4 ml de etanol

2.- Se disuelven 16 mg de Benzamidina en 1 ml de agua desionizada

## III. Tinción con plata

Todos los reactivos se preparan al momento de usarlos según las concentraciones de la técnica usando siempre agua desionizada.

## IV. Material biológico empleado

Para este trabajo se contó con un total de 16 muestras que corresponden a tejido tumoral de pacientes que se les detectó cáncer en el colon y 13 muestras de tejido de la mucosa normal adyacente al tumor de los mismos pacientes (en ocasiones no se contó con el tejido control correspondiente). Se utilizaron 7 muestras de tejido tumoral

y 6 controles correspondientes para la primera serie de geles y 8 muestras de tejido tumoral y 7 controles para la segunda serie de geles. Las condiciones de trabajo de las muestras en cada una de las series es detallada más adelante. Las muestras fueron obtenidas del Hospital de Nutrición, del Hospital de Cancerología, del Hospital de Oncología y del Hospital General y registradas por números progresivos. Los controles fueron registrados tomando el número de su tumor correspondiente.

El tejido control utilizado en este trabajo no presenta características morfológicas de la transformación maligna, sin embargo no se puede excluir la posibilidad de que existan alteraciones bioquímicas antes de que se manifiesten alteraciones morfológicas (10). Consideramos que el control más adecuado para este trabajo debería ser aquel que proviniera de una persona a la que no se le hubiera diagnosticado ningún tumor del intestino grueso, como pólipos o carcinomas. No se utilizó este control en el trabajo por la falta de material biológico, sin embargo aportaría mayor información del estado normal y de las proteínas que se modifican al transformarse la célula.

## Metodología

### I. Electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales

#### 1.1 Determinación del contenido de proteínas por gel

O'Farrell (14) señala que se puede aplicar más de 100 ug de proteína sin alterar de manera importante la resolución del sistema electroforético, pero que un exceso puede causar alteraciones en la posición y forma de las manchas.

La concentración de proteína presente en el tejido tumoral se determinó por el método de Lowry (37) utilizando 0.2 g de muestra la cual se homogeneizó en 1.5 ml de SDS al 10%, procesándose de la siguiente manera:

- 1.- Se depositaron 50 ul del homogenado en un tubo de ensayo.
- 2.- Se añadieron 5 ml de reactivo A ( 50 partes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en  $\text{NaOH}$  0.1N por una parte de tartrato de Sodio y potasio al 2% y  $\text{CuSO}_4$  al 1% (1:1)) y se dejaron reposar 10 minutos.
- 3.- Se agregaron 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 1:1 en agua desionizada y se dejaron reposar 30 minutos.
- 4.- Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro en la región visible a 750nm.

Una vez determinada la concentración de proteína por mg de tejido, se tomaron 0.2 g de tejido y 800 ul de amortiguador de la muestra hasta lograr una suspensión

homogénea con la ayuda de un mortero (ver detalles en la sección de preparación de la muestra). De ésta se tomaron alicuotas correspondientes a 50, 100, 200, 250 y 300 ug de proteínas, corriéndose cada una de ellas en una electroforesis bidimensional y visualizando las proteínas de los geles con la técnica de tinción con nitrato de plata (ambas técnicas son detalladas más adelante).

### 1.2 Preparación de la muestra

Todos los procedimientos para la preparación de la muestra deben evitar condiciones que alteren la constitución química de las proteínas.

La primera serie de geles con la concentración adecuada de proteínas fue realizada con 7 muestras de tejido tumoral y 6 controles colectados en hielo seco y tratados en ausencia de inhibidores de proteasas. El procedimiento es el siguiente:

1.- Se tomaron 0.2 g de tejido y homogeneizaron en mortero frío a -70 C.

2.- Se añadieron 800 ul de amortiguador para la muestra-SDS

3.- Se guardaron en copillas selladas

4.- Se colocó en una copilla la cantidad necesaria del homogenado anterior para tener una concentración adecuada de

proteína para ser aplicada en cada gel de la primera dimensión.

- 5.- Se agregaron 12 ul de solución A
- 6.- Se congelaron y descongelaron 5 veces a -70 C
- 7.- Se agregaron 3 ul de solución B. Agitar en vórtex
- 8.- Se agregó 1 ul de solución C. Agitar en vórtex
- 9.- Las copillas se colocaron en hielo mínimo 5 minutos
- 10.- Se añadieron 12 ul de solución A
- 11.- Se congelaron a -70 C en copillas selladas

Para la segunda serie de geles con la concentración adecuada de proteínas se tomaron 8 muestras de tejido tumoral y 7 controles colectados en nitrógeno líquido y tratadas en presencia de inhibidores de proteasas. Estas muestras fueron diferentes a las procesadas en la primera serie de geles. El procedimiento es el siguiente:

- 1.- Se tomaron 0.2 g de tejido y homogeneizaron en mortero frío en Nitrógeno líquido
- 2.- Se añadieron 800 ul de amortiguador para la muestra-SDS
- 3.- Se agregaron 10 ul de Pepstatin A y 10 ul de Benzamidina
- 4.- Se guardaron en copillas selladas

5.- Se agregó en una copilla la cantidad necesaria para tener una concentración de 200 ug de proteína para ser aplicada por gel de la primera dimensión

6.- Se agregaron 12 ul de solución A

7.- Se congelaron y descongelaron 5 veces a -70 C

8.- Se agregaron 3 ul de solución B. Agitar en vórtex

9.- Se agregó 1 ul de solución C. Agitar en vórtex

10.- Se colocó en hielo cuando menos 5 minutos

11.- Se añadieron 12 ul de solución A

12.- Se congelaron a -70 C en copillas selladas

### 1.3 Elaboración de los geles para la primera dimensión (14)

Para la preparación de 10 ml de gel se pesan 5.5 g de urea y se disuelven en solución de acrilamida al 30% (D), se adicionan 2 ml de NP-40 (E), 1.97 ml de agua destilada, 0.4 ml de anfolinas (pH 5-7) y 0.1 ml de anfolinas (pH 3-10). Se agita mecánicamente hasta disolver la urea. Después se agregan 10 ul de persulfato de amonio al 10% y 7 ul de TEMED concentrado. Se llenan los tubos del aparato (de 13 cm de largo) 3 cm abajo del extremo final, cuidando de no dejar burbujas sellando uno de los extremos con parafilm. El gel es cubierto con urea 8 mol/L (H). Después de 1 ó 2 h esta solución es removida y reemplazada por 20 ul de amortiguador de lisis (A). Antes de colocar los tubos en el aparato se quita este amortiguador y se le añade una cantidad similar de esta misma solución.

Se colocan los tubos en la cámara de electroforesis con el espacio para la muestra hacia arriba. Se colocan las soluciones electrodo: la solución cátodo ( $\text{NaOH}$  0.02 mol/L) en la cámara superior y la solución ánodo ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01 mol/L) en la cámara inferior.

Es necesario realizar una precorrida con el objeto de generar el gradiente de pH necesario, esto se logra de la siguiente manera: 200 volts durante 15 minutos, 300 volts, 30 minutos y 400 volts, 30 minutos.

Una vez terminada la precorrida se vacía la cámara superior del aparato y se quita el amortiguador de lisis del tubo. Se coloca la muestra en su lugar, la cual se cubrirá con 10  $\mu\text{l}$  de solución K. La cámara del aparato se llena de nuevo.

A continuación se corre la muestra por 12 h a 400 volts y 1 h a 800 volts.

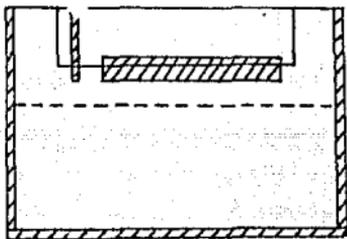
El gel se saca del tubo aplicando presión de aire por medio de una jeringa a la que se ha adaptado una punta para pipeta automática en su extremo. El gel se marca por el extremo ácido cortando ligeramente por el extremo ácido en forma transversal con una navaja. Se coloca en el amortiguador de la muestra-SDS por 1 1/2 h a temperatura

ambiente antes de congelarlo a  $-70^{\circ}\text{C}$  ó bien antes de correr la segunda dimensión.

#### 1.4 Elaboración de los geles de la segunda dimensión (9)

Se utilizan placas de vidrio de 14 cm por 17.5 cm. Se limpian perfectamente para evitar cualquier residuo de polvo o de grasa. Se montan las placas utilizando vaselina para sellar y separadores de 0.4 mm de espesor para darle al gel el espesor deseado y fijando ambas placas con broches a presión. Con un marcador se señala la distancia de 8.5 cm hasta la cual se va a colocar la solución de poliacrilamida al 12% correspondiente al gel separador. La solución de poliacrilamida al 12% se prepara con 6 ml de amortiguador del bajo gel (pH 8.8), 9.6 ml de acrilamida al 30%, 8.3 ml de agua, 0.066 ml de persulfato de amonio al 10% y 0.01 ml de TEMED concentrado. Se llena la placa hasta la marca con la solución de poliacrilamida al 12% y se cubre con alcohol isopropílico hasta que gelifique. Se elimina el alcohol isopropílico, se lava la superficie del gel con agua destilada y se seca perfectamente con papel filtro. Se añade la solución del gel concentrador hasta el borde de las placas (se mezclan 5 ml de amortiguador del sobregel (pH 6.8), 3.16 ml de acrilamida al 30%, 11.76 ml de agua destilada, 0.06 ml de persulfato de amonio al 10% y 0.02 ml de TEMED concentrado). Se cubre con un separador para alinear la superficie de este gel con la del gel de la

primera dimensión. Se coloca al mismo nivel otro separador en forma vertical en el extremo izquierdo de las placas con el fin de formar la bolsa donde se colocarán los marcadores de peso molecular. Lo anterior está esquematizado en la siguiente figura:



Una vez gelificado se elimina el separador horizontal y se seca ligeramente con papel filtro para eliminar la acrilamida sobrante. Se alinea el gel de la primera dimensión sobre el gel superior y se sella con agarosa. Se colocan las placas en el aparato de electroforesis y se llenan las cámaras con el amortiguador para la corrida II y se corre a 20 mA durante 4 1/2 h hasta 0.5 cm del final del gel.

## II. Tinción con plata (15)

Las proteínas se visualizaron mediante la técnica de tinción con nitrato de plata según la metodología siguiente:

1.- Se fijó el gel al menos 30 minutos en una solución de 50% metanol, 5% de ácido acético y 2% de  $\text{CuCl}_2$

2.- Se colocó 15 minutos en una solución de etanol 10% y ácido acético 5%

3.- Se sumergió 15 minutos en permanganato de potasio recién preparado al 0.01%

4.- Se lavó dos veces durante 15 minutos en etanol 10% y ácido acético 5%

5.- Se colocó 15 minutos en etanol 10%

6.- Se sumergió 20 minutos en nitrato de plata 0.1% fresco

7.- Se lavó una sola vez con agua desionizada

8.- Se reveló con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 8% y 0.02% de formaldehído recién preparado.

9.- Se detuvo la reacción con etanol 10% y ácido acético 5% durante 5 minutos.

10.- Se lavó varias veces con agua

11.- Se conservó en agua.

Todos los reactivos se preparan en agua desionizada.

La agitación suave es importante durante todo el proceso.

## Resultados y discusión

### I. Análisis de las proteínas por electroforesis bidimensional en ausencia de inhibidores de proteasas

#### 1.1 Determinación de la concentración de proteínas necesarias de aplicar por gel

Con el objeto de determinar la concentración más adecuada de proteínas necesaria para obtener una separación adecuada en la electroforesis en poliacrilamida bidimensional se tomó una muestra de tejido de colon de la cual se cuantificó la concentración las proteínas por mg de tejido siguiendo la técnica de Lowry (37), encontrando una concentración de 61.5 ug de proteína/mg de tejido (15.37 ug/ul).

La concentración adecuada de proteínas para obtener una buena separación y resolución fue de 200 ug al tefir con plata (se utilizaron 13.01 ul del homogenado del tejido de acuerdo con la metodología planteada en la sección correspondiente a la preparación de la muestra). Con esta concentración se logró la resolución de aproximadamente 200 proteínas diferentes, contadas en un gel correspondiente a una muestra tratada en ausencia de inhibidores de proteasas en donde la resolución y la tinción de las proteínas fue adecuada. O'Farrell (14) encontró que es posible obtener la

separación hasta de 5000 componentes diferentes en un sistema biológico. Esta diferencia podría explicarse quizá porque el total de los componentes de tejido no hubiera alcanzado a saturar el sistema electroforético.

En este trabajo se observó que a concentraciones de 50 y 100 ug de proteína por gel, algunas no alcanzaban a ser detectadas en el sistema. Por otro lado aumentó la resolución en regiones que se encontraban proteínas en alta concentración (especialmente la región ácida), por lo que estos geles aportaron información acerca del número total de proteínas y de su posición verdadera en dichas regiones.

A concentraciones de 250 y 300 ug de proteína por gel se encontró que la resolución disminuyó notablemente, resultando casi imposible definir regiones de alta concentración proteica (región ácida) distorsionando la forma y dificultando decidir dónde está la posición verdadera. Sin embargo aumentó el número de proteínas de baja concentración detectadas en la región básica.

En algunos de los geles correspondientes a tumores que fueron colectados en hielo seco y que no se les añadió Pepstatin A y Benzamidina como inhibidores de proteasas, no se observaron gran cantidad de proteínas de alta masa molecular en comparación con los tumores que fueron tratados con inhibidores de proteasas, y al parecer la cantidad total

de proteínas está disminuida. Sin embargo la mayoría de los patrones proteicos no muestran esta característica, pues en algunos geles se observa una gran cantidad de proteínas distribuidas en toda la superficie y una mayor concentración de proteínas de alta masa molecular.

Experimentos realizados con tumores de colon (11) en los cuales se trabajó en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas, se encontró que sólo el 25% de los patrones proteicos de los tumores mostraron deficiencia en componentes de alta masa molecular, cuando se trabajaba en ausencia de estos inhibidores mientras que el 75% restante de los tumores no mostró diferencia con los geles en presencia de estos inhibidores. Los mismos autores encontraron que las proteínas características del tumor no fueron degradadas por las proteasas presentes en el tejido. Lo anterior parece indicar que el tejido de diferentes pacientes varía en su concentración de proteasas, o bien que existen ciertas enzimas que presentan elevada actividad degradando parte de las proteínas presentes en el tejido. En relación al trabajo anterior, la presente investigación aporta datos que permiten corroborar que existen proteínas características del tumor, además de que se presentan proteínas (específicamente las proteínas 4, 5, 28 y 29) que son características del estado neoplásico. Los patrones proteicos encontrados por Tracy y Wold (11) y aquellos mostrados en el presente trabajo son sustancialmente

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

diferentes. En este sentido la diferencia podría radicar en el hecho de que las proteínas provienen de tejido de poblaciones con características étnicas distintas.

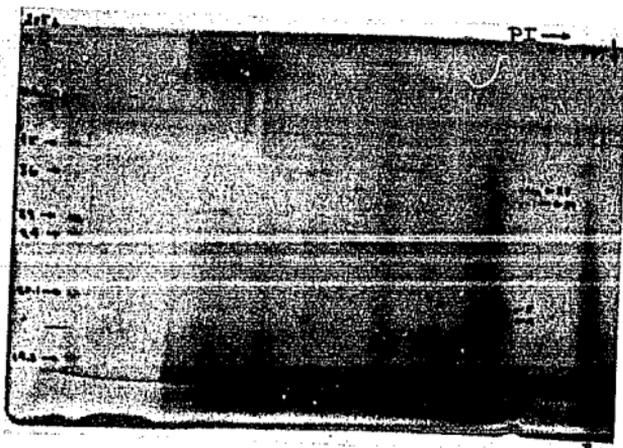
En cuanto a las muestras de los tumores analizados en este trabajo y que fueron colectadas en nitrógeno líquido y tratadas con inhibidores de proteasas, se observa mayor concentración de proteínas de alto peso molecular, en comparación con aquellos geles cuyas muestras no fueron tratadas con dichos inhibidores. En cuanto a los componentes de alta masa molecular de la muestra, se detectaron mayor cantidad de éstos, aunque la diferencia parece no ser importante. De esto pueden derivar dos alternativas: a) la degradación en los geles sin los inhibidores de proteasas fue mínima y por esto no se ve la diferencia entre los geles con inhibidores (suponiendo que éstos fueran los adecuados) o b) el grado de degradación fue alto en los dos casos y se necesitaría incrementar el tipo de inhibidores de proteasas.

Lo adecuado es recolectar la muestra de tejido fresco en una solución que contenga distintos tipos de inhibidores de proteasas y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido dentro de los 15 minutos después de extraer el tumor del paciente, inclusive dentro de la misma sala de operaciones, ya que del tiempo que la muestra se encuentre a temperatura ambiente y de las condiciones de recolección dependerá el éxito de la investigación.

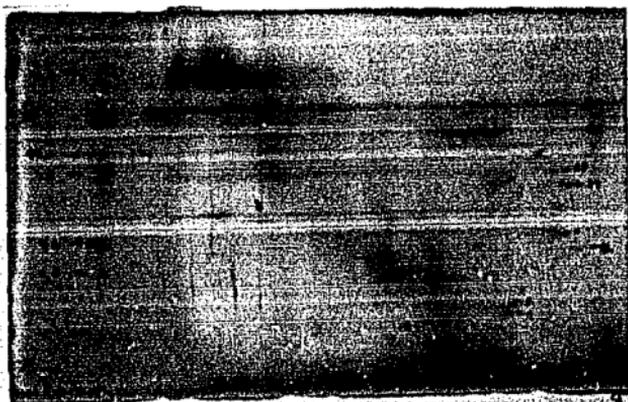
1.2 Geles de poliacrilamida en dos dimensiones en ausencia de inhibidores de proteasas de tumores moderadamente diferenciados



Gel 1.- Control 3



Gel 2.- Tumor 3. Adenocarcinoma medianamente diferenciado



Gel 3.- Tumor 9. Adenocarcinoma medianamente diferenciado

A) Análisis de los tumores moderadamente diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas

Se compararon cada uno de los patrones de proteínas de los dos adenocarcinomas medianamente diferenciados 3 y 9 y el control 3 (geles 1, 2 y 3), numerando arbitrariamente las proteínas que pudieran dar información acerca de su expresión en las células tumoral y normal. Las proteínas con masas moleculares de 23,700, 24,000, 18,200, 15,000, 45,100 y 20,000 daltons (correspondientes a las proteínas 6, 7, 16, 22, 24 y 25, gel 1), se encuentran presentes en el control normal y ausentes en los adenocarcinomas medianamente diferenciados (Tabla 1).

TABLA 1.- PROTEINAS AUSENTES EN LOS ADENOCARCINOMAS MEDIANAMENTE DIFERENCIADOS

PROTEINA	CONTROL 3	TUMOR 3	TUMOR 9	M.Mol.(D)
6	+	-	-	23,700
7	+	-	-	24,000
16	+	-	-	18,200
22	+	-	-	15,000
24	+	-	-	45,100
25	+	-	-	20,200

Usando el mismo criterio anterior se llevó a cabo la numeración de las proteínas de los tumores y el control, en los geles 2 y 3 (Tabla 2) se muestran cuatro proteínas cuyos pesos moleculares son de 22,000, 22,500, 35,700, 34,200 Daltons (ver proteínas 4, 5, 28 y 29), que se encuentran presentes en los dos tumores medianamente diferenciados, y ausentes en el control normal (ver gel 1). Estas proteínas se encuentran también presentes en las muestras de tumores bien diferenciados. Es evidente la variación en la concentración de las proteínas detectadas (expresión relativa) en el tejido neoplásico. Existe evidencia experimental de que durante la progresión tumoral se produce pérdida de la regulación metabólica, amplificación o falta de expresión de ciertas regiones génicas, la cual se

traduce en alteraciones a nivel transcripcional y/o translacional (12). Los resultados presentados en este trabajo amplían la evidencia experimental anteriormente mencionada.

**TABLA 2.- EXPRESION RELATIVA DE PROTEINAS EN LOS ADENOCARCINOMAS MEDIANAMENTE DIFERENCIADOS**

PROTEINA	CONTROL 3	TUMOR 3	TUMOR 9	M.Mol.(D)
4	-	+++	++	22,000
5	-	+++	++	22,500
26	-	++	+++	35,700
29	-	++	+++	34,200

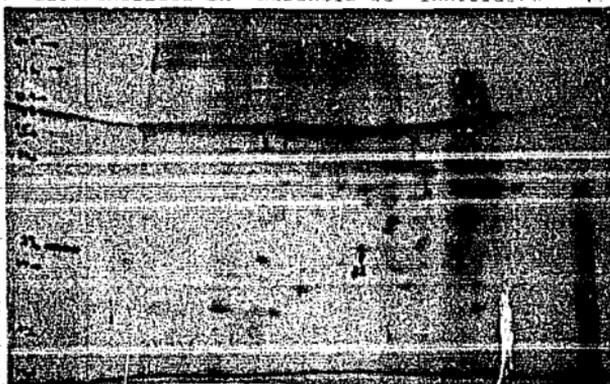
En la Tabla 3 se muestran aquellas proteínas de masa molecular de 33,000, 34,800, 32,000, 29,000 y 44,000 daltons, cuya presencia varía entre los tumores 3 y 9 y el tejido control 3 (geles 1, 2 y 3, proteínas 2, 10, 11, 12 y 23), posiblemente siendo específicas del desarrollo tumoral. El hecho de que en un tumor estas proteínas estén presentes y en otros no se expresen, podría indicar que los tumores se encuentran en etapas de progresión tumoral diferente. El cáncer de colon es una neoplasia que representa un proceso multietapas (5), existiendo factores exógenos y endógenos que de alguna manera influyen en el cambio bioquímico y morfológico de las células del epitelio de la mucosa. La gran variedad de estos factores da la pauta

para que se expresen en la célula una serie de cambios específicos en cada una de ellas, mostrando un mosaico fenotípico y genotípico diferente.

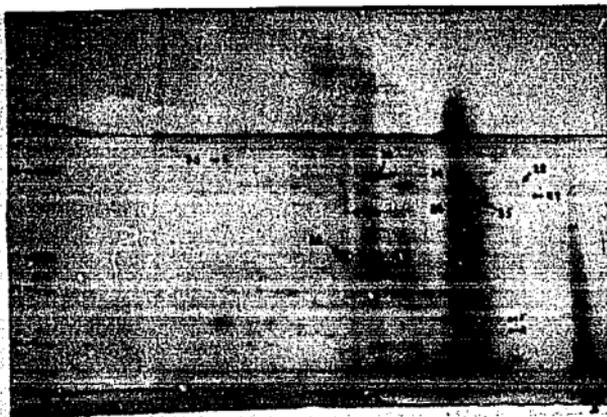
TABLA 3.- COMPARACION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS ENTRE LOS ADENOCARCINOMAS MEDIANAMENTE DIFERENCIADOS

PROTEINA	CONTROL 3	TUMOR 3	TUMOR 9	M.Mol.(D)
2	+	-	+	33,000
10	-	-	+	34,800
11	-	-	+	32,000
12	-	-	+	29,000
23	+	+	-	44,000

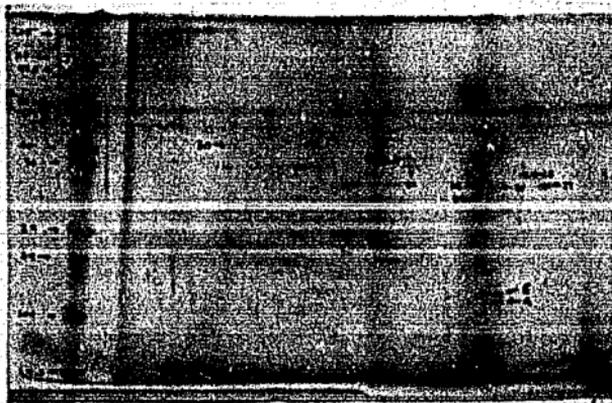
1.3 Geles de poliacrilamida en dos dimensiones de tumores bien diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas



Gel 4.- Control 5



Gel 5.- Tumor 5. Adenocarcinoma bien diferenciado



Gel 6.- Tumor 1. Adenocarcinoma bien diferenciado

B) Análisis de tumores bien diferenciados en ausencia de inhibidores de proteasas

Al analizar los patrones de proteínas en los geles de los adenocarcinomas bien diferenciados 1 y 5 y el tejido control 5, se observa la ausencia de dos proteínas ácidas de masa molecular de 36,000 daltons con diferente punto isoeléctrico (gel 4, proteínas 26 y 27). Estas proteínas se encuentran presentes en el tejido control y ausentes en los adenocarcinomas (Tabla 4).

TABLA 4.- PROTEINAS AUSENTES EN LOS ADENOCARCINOMAS BIEN DIFERENCIADOS

PROTEINA	SIN INHIBIDORES DE PROTEASAS			CON INHIBIDORES	M.Mol.(D)
	CONTROL 5	TUMOR 5	TUMOR 1	TUMOR 33	
26	+	-	-	-	36,000
27	+	-	-	-	36,000

En la Tabla 5 se muestran las proteínas de masa molecular de 35,700, 34,200 y 37,500 daltons (correspondientes a las proteínas 28, 29 y 30, geles 4, 5 y 6), las cuales están presentes en el tejido tumoral y ausentes en el tejido control correspondiente. Hay que hacer hincapié que las proteínas 28 y 29 también se encuentran presentes en los adenocarcinomas medianamente diferenciados.

**TABLA 5.- PROTEINAS PRESENTES EN LOS ADENOCARCINOMAS BIEN DIFERENCIADOS EN RELACION AL CONTROL NORMAL**

PROTEINA	SIN INHIBIDORES DE PROTEASAS			CON INHIBIDORES	M.MOL.(D)
	CONTROL 5	TUMOR 5	TUMOR 1	TUMOR 33	
28	-	+	+	+	35,700
29	-	+	+	+	34,200
30	-	+	+	+	37,500

Existe un grupo de 6 proteínas comunes con los tejidos tumorales y control, con masas moleculares de 35,480, 29,000, 36,000, 35,500, 35,100 y 35,000 daltons (proteínas 31, 32, 33, 34, 35 y 36 geles 4, 5 y 6), cuya concentración varía entre los patrones electroforéticos obtenidos para ellas, sugiriendo desajuste en la expresión genética (Tabla 6).

TABLA 6. EXPRESION RELATIVA DE PROTEINAS EN LOS  
ADENOCARCINOMAS BIEN DIFERENCIADOS

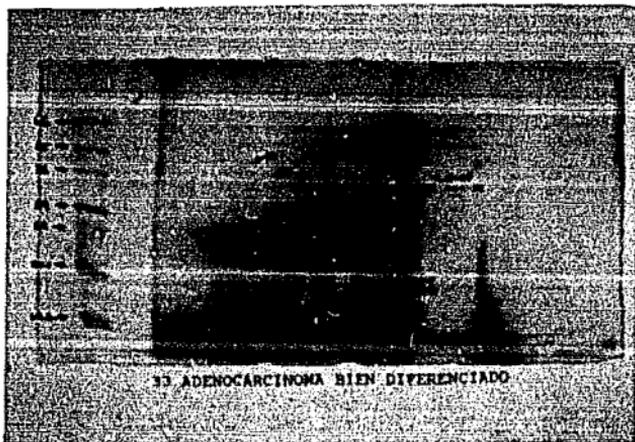
PROTEINA	SIN INHIBIDORES DE PROTEASAS			CON INHIBIDORES	M.mol.(D)
	CONTROL 5	TUMOR 5	TUMOR 1	TUMOR 33	
31	+++	++	+	+	35,480
32	-	++	++	-	29,000
33	+++	++	++	+	35,000
34	+++	+++	+	++	35,500
35	++++	++++	+	++	35,100
36	+++	+++	+	++	35,000

II. Análisis de las proteínas por electroforesis  
bidimensional en presencia de inhibidores de proteasas

En el presente trabajo se decidió usar como inhibidores de proteasas Pepstatin A y Benzamidina debido a que ambos son utilizados en un trabajo previo en donde los autores utilizan colon humano como muestra biológica (11). El Pepstatin A es un inhibidor de pepsina. En el tejido de colon existe una alta concentración de proteasas (específicamente alta en el tejido tumoral) que podría afectar el patrón electroforético de las proteínas obtenido en los experimentos. De esta manera se podrán comparar los resultados provenientes de las muestras tratadas en ausencia

de inhibidores con aquellas tratadas en presencia de inhibidores y así poder evaluar el grado de integridad que presentan las proteínas a consecuencia de las condiciones intrínsecas del tejido.

## 2.1 Gel de poliacrilamida en dos dimensiones en presencia de inhibidores de proteasas



Gel 7. Tumor 33. Adenocarcinoma bien diferenciado

## 2.2 Comparación de los patrones proteicos de tejidos tumorales y controles

El tumor 33 corresponde a un adenocarcinoma de colon bien diferenciado. El patrón proteico fue comparado en base

a los resultados obtenidos para los adenocarcinomas bien diferenciados tratados en ausencia de inhibidores de proteasas. Los resultados fueron los siguientes:

En la Tabla 4 se muestran dos proteínas ausentes en los adenocarcinomas bien diferenciados. Ambas proteínas ácidas con diferente punto isoeléctrico de masa molecular de 36,000 daltons fueron encontradas en el control 5 (ver gel 4). No existe diferencia en la expresión de estas dos proteínas en las muestras tratadas en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas.

Se identificaron tres proteínas en el adenocarcinoma bien diferenciado (Tumor 33) de masa molecular de 35,700, 34,200 y 37,500 Daltons (proteínas 28, 29 y 30, gel 7) que corresponden a las encontradas en los adenocarcinomas bien diferenciados tratados en ausencia de inhibidores (geles 5 y 6, ver la Tabla 5 en la columna correspondiente a la muestra tratada con inhibidores de proteasas). La proteína de masa molecular 37,500 Daltons (proteína 30, geles 5, 6 y 7) únicamente se expresa en los adenocarcinomas bien diferenciados por lo que podría ser considerada como característica del estado de diferenciación celular (Tabla 5).

En cuanto a la expresión relativa, es decir la variación en la concentración de una misma proteína en

diferentes muestras, se observan las mismas proteínas en los adenocarcinomas en presencia y ausencia de inhibidores con excepción de la proteína de masa molecular de 29,000 D (Tabla 6). La expresión de las proteínas para el tumor con inhibidores se ve disminuida en relación con el tumor sin inhibidores. Este efecto podría atribuirse a la concentración de las proteínas en la muestra de tejido y no a la variación en el manejo de la muestra.

Integrando la información obtenida de la Tablas 4, 5 y 6 se desprende que el efecto de las proteasas no dañó en gran medida a las proteínas que se están analizando.

En este trabajo se han encontrado cuatro proteínas de carácter ácido de masa molecular de 35,700, 34,200, 22,000 y 22,500 Daltons (proteínas 28, 29, 4 y 5, geles 2, 3, 5, 6 y 7) que se expresan en mayor o en menor concentración, pero de manera constante, tanto en los adenocarcinomas medianamente diferenciados como en los bien diferenciados (Tabla 7). Sus masas moleculares no corresponden a ningún oncogene descubierto hasta el momento. Se sabe que en el tejido tumoral existe una mayor concentración de enzimas proteolíticas que en el tejido normal, por lo que cabría la posibilidad de que estas dos proteínas fueran productos de degradación. Lo anterior no es apoyado por los experimentos en presencia de inhibidores de proteasas en donde estas cuatro proteínas también se observan. Sería conveniente

seguir con estos experimentos con el fin de conocer con que frecuencia se presentan en los tejidos tumorales de colon, y así con la suficiente evidencia experimental, poder llegar a considerarlas como posibles proteínas marcadoras del cáncer colorrectal.

TABLA 7. PROTEINAS PRESENTES EN LOS ADENOCARCINOMAS MEDIANAMENTE Y BIEN DIFERENCIADOS

PROTEINA	M.mol.(D)	MEDIANAMENTE DIFERENCIADOS		BIEN DIFERENCIADOS		
		SIN INHIBIDORES DE PROTEASAS				CON INHIBIDORES
		TUMOR 3	TUMOR 9	TUMOR 5	TUMOR 1	TUMOR 33
29	35,702	+	+	+	+	+
29	34,200	+	+	+	+	+
4	21,000	+	+	+	+	+
5	22,500	+	+	+	+	+
38	37,500	-	-	+	+	+

Muchos investigadores han tratado de encontrar marcadores propios del estado canceroso o bien que sean específicas del estado no transformado para poder detectar y monitorear el cáncer colorrectal (11). Aunque se han logrado avances en este sentido (ver sección de marcadores tumorales), no se ha identificado un marcador plenamente confiable que pudiera ayudar al pronóstico de sobrevida del paciente.

## Conclusiones

De los resultados obtenidos es de destacarse la presencia de 15 proteínas que varían entre los adenocarcinomas medianamente diferenciados y el tejido control. Las diferencias en la expresión de proteínas totales analizadas en los tumores bien diferenciados fue de 11 proteínas. En ambos casos el análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo en tumores tratados en ausencia de inhibidores de proteasas. Parece existir menor alteración en la expresión de proteínas en tumores bien diferenciados posiblemente debido a que la célula del adenocarcinoma bien diferenciado es fenotípicamente similar a la normal.

Es necesario hacer hincapié en la presencia de las proteínas de masa molecular 35,700, 34,200, 22,000 y 22,500 Da (proteínas 28, 29, 4 y 5) en tejidos tumorales medianamente diferenciados y bien diferenciados y su ausencia en los tejidos controles analizados. El hallazgo de estas proteínas abre una amplia línea de investigación encaminada hacia el conocimiento de su estructura y funcionamiento como posibles marcadores tumorales dentro de los eventos moleculares relacionados con el desarrollo del cáncer colorrectal.

Los resultados de los geles analizados de los 7 tejidos tumorales y 6 controles tratados en ausencia de

inhibidores de proteasas y de los 8 tumores y 7 controles tratados en presencia de inhibidores de proteasas muestran que entre ellos existen alteraciones en la expresión de las proteínas. Otros investigadores han demostrado que en los tumores se presentan alteraciones en los cromosomas 5, 17, 18 y 11 y en los oncogenes myc, src, ras, myb, fyn y yes por lo que es de esperarse la variación en la expresión de proteínas.

Los patrones electroforéticos de las proteínas de los tumores muestran que no hay concordancia entre el tipo histológico al que corresponde el tumor y la expresión genética de la célula, es decir que células correspondientes al mismo tipo histológico muestran diferentes patrones electroforéticos de proteínas.

Las diferencias obtenidas entre los adenocarcinomas con el mismo grado de diferenciación así como entre los tumores con distinto grado de diferenciación celular, pueden deberse a estadios en el avance de la enfermedad. Otro parámetro que hay que tomar en cuenta es que las muestras analizadas provienen de distintos pacientes que presentan antígenos propios del tumor.

En base a los resultados obtenidos en presencia de inhibidores de proteasas se puede concluir que no parece haber degradación importante en las proteínas presentes en

el tejido. Estudios posteriores deben llevarse a cabo aumentando el número de muestras, el tipo de inhibidores de proteasas y utilizando nitrógeno líquido, para obtener un mejor control en la manipulación del tejido.

En relación a los objetivos planteados al inicio del trabajo, éstos fueron cumplidos parcialmente, ya que sólo se encontró una sola proteína característica del estado de diferenciación (proteína 30, gel 5, 6 y 7, Tabla 7). Sin embargo el hallazgo de las proteínas 28, 29, 4 y 5 que parecen ser características del estado neoplásico en cáncer de colon son resultados todavía más interesantes e importantes para la investigación tanto básica como clínica, sentando las bases para trabajos posteriores de identificación de la estructura y función, o bien para utilizarlos como marcadores tumorales del cáncer de colon.

**APENDICE**

Tabla A  
Porcentaje de incidencia de cáncer por región anatómica en  
la población mexicana de la Ciudad de México en 1988 (28)

	Región anatómica	%
1	Cérvix	18.57
2	Piel	10.94
3	Mama	10.81
4	Ganglio linfático	5.21
5	Tej. hematopoyético	4.79
6	Desconocido	4.67
7	Próstata	4.5
8	Estómago	4.43
9	Pulmón	2.6
10	Ovario y anexos	2.45
11	Tiroides	2.42
12	Encéfalo	2.4
13	Vejiga urinaria	2.23
14	Colon	2.17
15	Cuerpo del utero	2.13
16	Tejido Conjuntivo	1.88
17	Vesicula biliar	1.7
18	Testículo	1.66
19	Riñón-uréter	1.58
20	Recto-ano	1.55

Tabla B  
Porcentaje de incidencia de cáncer por región anatómica en  
la población masculina de la Ciudad de México en 1988 (28)

	Región anatómica	%
1	Piel	14.0
2	Próstata	12.16
3	Ganglio linfático	8.67
4	Tej. hematopoyético	6.51
5	Estómago	6.31
6	Desconocido	5.56
7	Pulmón	4.57
8	Testículo	4.48
9	Vejiga urinaria	4.37
10	Encéfalo	3.75
11	Laringe	3.25
12	Colon	2.94
13	Tej. conjuntivo	2.48
14	Riñón-uréter	2.38
15	Recto-ano	2.12
16	Huesos y articulaciones	1.95
17	Boca-encia	1.91
18	Esófago	1.39
19	Tiroides	1.23

Tabla C  
 Porcentaje de incidencia de cáncer por región anatómica en  
 la población femenina de la Ciudad de México en 1988 (28)

	Región anatómica	%
1	Cérvix	29.5
2	Mama	17.1
3	Piel	9.16
4	desconocido	4.14
5	Ovario y anexos	3.89
6	Tej. hematopoyético	3.77
7	Cuerpo del útero	3.38
8	Estómago	3.32
9	Ganglio linfático	3.17
10	Tiroides	3.12
11	Vesícula biliar	2.01
12	Colon	1.71
13	Encéfalo	1.6
14	Tej. conjuntivo	1.53
15	Pulmón	1.45
16	Recto-ano	1.21
17	Riñón-uréter	1.11
18	Vulva-vagina	1.03
19	Vejiga urinaria	0.99
20	Boca-encia	0.87

## Bibliografía

- 1.- Hunter T. The Proteins of Oncogenes. Scientific American (1984) 251 (2): 60-69.
- 2.- Williams, A. C., Harper S.J. , and Paraskeva, C. Neoplastic Transformation of a Human Colonic Epithelial Cell Lines: In vitro Evidence for the Adenoma to Carcinoma Sequence. Cancer Research 50: 4724-4730, 1990.
- 3.- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. "Biología Celular y Molecular". Primera Edición. Editorial Labor. España, pp. 1031-1076, 1988.
- 4.- Berk, J.E., Haubrich, W.S., Kalser, M.H., Roth, J.L.A., Schaffner, F. Bockus. Gastroenterología. Tomo IV. 4ª Edición. Salvat Editores, S.A. España, pp. 2721-2731, 2765-2813, 1987.
- 5.- Feinberg, A.P., Law, D.J., Lefrançois, D., Delattre, O., and Thomas G. A Multistep Genetic Model of Human Colorectal Carcinogenesis. Cancer Cells 7: 245-248. Molecular Diagnosis of Human Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

6.- Ngoi, I. S. Goldman, T. Godwin, J. Felix, J. J. DeCosse, and B. Rigas. Reduced Expression of HLA Class I and II Antigens in Colon Cancer. *Cancer Research* 50: 8023-8027, 1990.

7.- E.J. Sinkeldam, C.F. Kuper, M.C. Bosland, V.M.H. Hollanders, and D.M. Vedder. Interactive effects of dietary wheat bran and lard on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 50: 1092-1096, 1990.

8.- A.J. Best, P.K. Das, H.R.H. Patel, and C.J.F. Van Noorden. Quantitative Cytochemical Detection of Malignant and Potentially Malignant Cells in the Colon. *Cancer Research* 50: 5112-5118, 1990.

9.- Laemmli Y.K., *Nature* vol 227: 680-685, 1970.

10.- Thorsrud, A.k., Vatn, M.H., Jellum, E. Two-Dimensional Electrophoretic Patterns of Proteins of Normal Mucosa, Polyps, and Carcinomas of the large Intestine. *Clinical Chemistry* 28 (4): 884-889, 1982.

11.- R.P. Tracy, L.E. Wold, R.M. Currie, and D.S. Young. Patterns for Normal Colon Mucosa and Colon Adenocarcinoma Compared by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Clinical Chemistry* 28 (4): 915-919, 1982.

12.- Dulbecoo, R. La Naturaleza del cáncer. Mundo Científico. 3 (22):168-179, 1985.

13.- Garcia Garcia, Germán et al. El conocimiento moderno de la biología del cáncer. Simposio. Gaceta Médica de México. 125, (3-4): 69-88, 1989.

14.- O'Farrell, P. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. The Journal of Biological Chemistry, 250 (10): 4007-4021, 1975.

15.- Morrissey, J.H. Silver Stain for proteins in Polyacrylamide Gels: A modified procedure with enhanced uniform Sensitivity. Analytical Biochemistry, 317:307-315, 1981.

16.- Bruce, R.W. Recent Hypotheses for the Origin of Colon Cancer. Cancer Res. 47: 4237-4242, 1987.

17.- Weinstein, I.B., The Origins of Human Cancer: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatment-Twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial Award Lecture. Cancer Res. 48: 4135-4143, 1988.

18.- Guyton. Anatomia y fisiología Humana.

19.- Truelove, S.C., Reynell, P.C. Reynell. Enfermedades del aparato digestivo. 3ª edición. Editorial Científico Médica Dossat Mexicana S.A., México 1977.

20.- Alitalo K. Amplificación of cellular oncogenes in cancer cells. TIBS-May, 194-197, 1985.

21.- Hunter T. Oncogenes and growth control. TIBS-July, 275-280, 1985.

22.- Bishop, M.J. Oncogenes. Scientific American, 63-74, 1982.

23.- Cancer Genes: Rare recombinants instead of activated oncogenes (a Review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 2117-2124, 1987.

24.- N. Rosen, O. Sartor, F.M. Foss, A. Veillette, and J.B. Bolen. Altered Expression of src-related Tyrosine Kinases in Human Cancer, Cancer Cell 7: 161-166, Molecular Diagnosis of Human Cancer, 1989.

25.- Ratner, L., S.F. Josephs, and Wong-Staal. Oncogenes: Their Role in Neoplastic Transformation. Ann. Rev. Microbiol., 39: 419-449, 1985.

26.- Preston-Martin S., C.M. Pike, Ross R.K. Jones P.A., y Henderson B.E. Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer. *Cancer Research* 50: 7415-7421, 1990.

27.- Registro Nacional del Cáncer. Resultados 1987, Ciudad de México. 2ª Edición. Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Crónicas y Accidentes. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología.

28.- 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.

29.- Klurferd, D.M., Weber, M.M., Kristchevsky, D. Inhibition of Chemically Induced Mammary and Colon Tumor Promotion by Caloric Restriction in Rats Fed Increased Dietary Fat. *Cancer Research* 47: 2759-2762, 1987.

30.- Yamori, T., Hitomi, K., Stewart, K., Ota, D.M., Cleary, K.R., and Irimura, T. Differential Production of High Molecular Weight Sulfated Glycoproteins in Normal Colonic Mucosa, Primary Colon Carcinoma, and Metastases. *Cancer Research* 47: 2741-2747, 1987.

31.- Erisman, M.D., Litwins, S., Keidan, R.D., Comis R.L., and Austrin, S.M. Noncorrelation of the Expression of the c-

myc Oncogene in Colorectal Carcinoma with Recurrence of Disease or Patient Survival. Cancer Res. 48:1350-1355, 1988.

32.- McCormick, F. ras GTPase Activating Protein: Signal transmitter and Signal Terminator. Cell, 56: 5-8, 1989.

31.- Weinberg, R.A. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

34.- Green, M.R., When the products of Oncogenes and Anti-Oncogenes Meet. Cell 56: 1-3, 1989.

35.- Tarin, D. Molecular Genetics of Metastasis. Metastasis. Willey, Chichester (Ciba Foundation Symposium 141), 149-169, 1988.

36.- Harrison. Principios de Medicina Interna. Interamericana Mc. Graw-Hill. Tomo II. 7ª Edición en Español, 1987. pp1592-1595.

37.- Methods in Enzimology Vol III, sección IV Proteins and Derivatives. II. Protein Estimation with the Folin-Ciocalteu reagent. Academic Press Publishers. New York, 1957. pp 448-450.

38.- Weinberg, C., C.C. Thompson, E.S. Ong, R. Lebo, D.J. Gruol, R.M. Evans. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature 324 (18): 641-676, 1986.

39.- Weir D.M. Inmunología. Primera Edición. Manual Moderno. México, D.F., 1990, pp 208-211.

40.- Vargas Dominguez, A. Gastroenterología. Primera Edición. Mc. Graw-Hill, 1989, México, D.F., pp 278-283.