



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal: Prof. Beatriz Albina Medina Jimenez
Secretario: Prof. Raul Genaro Aguilar Caballero
1er. Suplente: Prof. Alicia Cervantes Peredo
2do. Suplente: Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes



Sitio donde se desarrollo el tema.

Laboratorio de Investigación en Cáncer. Departamento de Biología. Facultad de Química.
U.N.A.M.

Unidad de Biología Molecular Aplicada a la Salud Reproductiva. FES-Zaragoza,
U.N.A.M.- Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Asesor del Tema:

Dra. Angelina Quintero Ruiz.

Supervisor Técnico:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Sustentante:

Carmen Adriana Mendoza Rodríguez.

**A mis padres, por el amor y apoyo que me han
dado durante toda mi vida y en todos los
proyectos que se me ocurre meterme.**

A Juan Carlos, por su ayuda y dedicación que permitió llevar a fin este proyecto. Gracias mi amor.

A mis hermanos, por compartir conmigo tanto triunfos como derrotas.

A mis amigos (as), porque siempre han estado cuando más los he necesitado.

**Esta tesis está dedicada a mi abuelo, Adolfo
Mendoza, ya que el cáncer se lo llevó poco tiempo
después de conocerlo.**

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Angelina Quintero, por su paciencia y dedicación en enseñarme un área de la bioquímica totalmente nueva para mí.

Al Dr. Marco A. Cerbón y sus estudiantes de la Unidad de Biología Molecular Aplicada a la Salud Reproductiva, FES-Zaragoza, UNAM- Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán por la ayuda otorgada en la realización de la parte experimental de esta tesis.

Al Dr. Santiago Payan, Dr. Rafael Padilla y Dr. Luna del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su colaboración al proporcionar el material biológico.

INDICE

1. INTRODUCCION.	1
2. OBJETIVOS.	3
3. ANTECEDENTES.	4
3.1. CONCEPTO DE CANCER.	4
3.2. CANCER COLORRECTAL.	5
3.2.1. Adenocarcinomas colorrectales.	5
3.2.2. Epidemiología.	6
3.2.3. Etiología.	7
3.2.4. Influencia de los factores ambientales.	7
3.2.5. Influencia de eventos en la superficie del epitelio celular.	9
3.2.6. Influencia de factores hereditarios.	10
3.2.7. Estratificación del cáncer colorrectal.	10
3.3. ORIGEN MOLECULAR DEL CANCER.	12
3.3.1. Naturaleza clonal del cáncer colorrectal.	12
3.3.2. Alteraciones genéticas en oncogenes.	13
3.3.3. Pérdida de alelos y genes supresores de tumores.	14
3.3.4. Genes supresores de tumores y modelo recesivo.	16
3.3.5. Pérdidas alélicas múltiples en tumores colorrectales.	18
3.3.6. La acumulación de cambios, más que el orden, es lo más importante.	20
3.4. C-MYC.	22
3.4.1. Estructura.	22
3.4.2. Función.	23
3.4.3. Expresión del gen de c-myc.	23
3.4.4. Mecanismos de activación.	25
3.5. C-FOS.	26
3.5.1. Generalidades.	26
3.5.2. Estructura.	27
3.5.3. Función.	28
3.5.4. Regulacion de la expresión de c-fos.	29
3.6. C-KI-RAS.	30
3.6.1. Generalidades.	30

3.6.2. Estructura.	30
3.6.3. Región de unión a GTP.	31
3.6.4. Región variable.	32
3.6.5. Región de unión al receptor.	32
3.6.6. Función.	33
3.6.7. Ras en el contexto del cáncer.	36
3.7. P53.	37
3.7.1. Estructura.	37
3.7.2. Función molecular de p53 tipo silvestre y mutado.	38
3.7.3. Regulación de la función de p53.	41
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	44
4.1. REACTIVOS.	44
4.2. SOLUCIONES.	46
4.2.1. Soluciones utilizadas en la minipreparación y amplificación de los plásmidos.	46
4.2.2. Soluciones utilizadas en la digestión enzimática de los plásmidos.	49
4.2.3. Soluciones utilizadas en la purificación del cDNA.	50
4.2.4. Soluciones utilizadas en la extracción de RNA.	51
4.2.5. Soluciones utilizadas en la electroforesis de RNA.	52
4.2.6. Soluciones utilizadas en la transferencia a filtros de nylon.	53
4.2.7. Soluciones utilizadas en la hibridación Northern Blot.	53
4.2.8. Soluciones utilizadas en la remoción de las sondas radioactivas.	55
4.3. PROCEDIMIENTO.	55
4.3.1. Minipreparación de los plásmidos.	55
4.3.2. Amplificación de los plásmidos.	57
4.3.3. Digestión enzimática de los plásmidos.	59
4.3.4. Purificación del cDNA.	60
4.3.5. Extracción de RNA.	62
4.3.6. Electroforesis de RNA.	63
4.3.7. Transferencia a filtros de nylon.	64
4.3.8. Hibridación Northern blot.	66
4.3.9. Autorradiografía.	69
4.3.10. Remoción de la sonda radioactiva de las membranas de nylon.	70
4.3.11. Cuantificación densitométrica.	70

5. RESULTADOS.	71
5.1. AMPLIFICACION, DIGESTION ENZIMATICA Y PURIFICACION DE LOS cDNA.	71
5.2. EXTRACCION Y PURIFICACION DEL RNA DE LAS BIOPSIAS.	75
5.3. HIBRIDACION DE LOS RNA CON EL cDNA DE CADA GEN.	78
5.4. DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES.	83
5.5. GRADO DE EXPRESION DE CADA GEN ESTUDIADO Y SU CORRELACION CLINICA.	83
6. DISCUSION.	86
6.1. EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53 SE SOBREENPRESA EN TODOS LOS TUMORES.	86
6.2. EL ONCOGEN C-MYC SE SOBREENPRESA EN TODOS LOS TUMORES.	89
6.3. EL ONCOGEN C-FOS SE SOBREENPRESA EN CUATRO DE LOS CINCO TUMORES ESTUDIADOS.	90
6.4. EL ONCOGEN C-KI-RAS SE SUBEXPRESA EN CUATRO DE LOS CINCO TUMORES Y SE SOBREENPRESA SOLAMENTE EN UN TUMOR.	91
7. CONCLUSIONES.	94
8. BIBLIOGRAFIA.	95

ABREVIACIONES

a.a.	Aminoácidos.
bHLH	Región de a.a básicos seguido por un motivo hélice-giro- hélice.
bZip	Región de a.a básicos seguido por un motivo denominado "zipper" de leucina.
c-fos	Proto-oncogen c-fos.
c-Fos	Proteína del proto-oncogen c-fos.
c-jun	Proto-oncogen c-jun.
c-Jun	Proteína del proto-oncogen c-jun.
c-myc	Proto-oncogen c-myc.
c-Myc	Proteína del proto-oncogen c-myc.
CREB	Proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP.
CREs	Elementos de respuesta dependientes de cAMP.
DSE	Elemento de simetría doble.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos.
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
GAP	Proteína activadora de actividad GTPasa.
HPV	Papilomavirus humano.
kDa	Kilodaltones.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
p53m	Proteína del gen supresor de tumores p53 tipo mutado.
p53wt	Proteína del gen supresor de tumores p53 tipo silvestre.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
ras	Proto-oncogen ras.
Ras	Proteínas de los proto-oncogenes ras.
SRE	Elemento de respuesta a suero.
SRF	Factor de respuesta a suero.
SV40	Virus de simio.
TPA	12-O-Tetradecanoil-forbol-13 acetato.
TRE	Elemento de respuesta a TPA.

1. INTRODUCCION.

El cáncer se puede definir como un conjunto de células que presentan un desorden fundamental en el control del crecimiento y diferenciación celular. Este es un proceso multietapas y multifactorial. Esto quiere decir que para que una célula se transforme de célula normal a célula cancerígena tiene que pasar por una serie de etapas en las cuales se van acumulando diferentes alteraciones en los genes que regulan el crecimiento y la diferenciación celular (esto es, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores).

El cáncer colorrectal es un excelente sistema para estudiar estos eventos ya que se pueden conseguir tejidos en varios estadios de desarrollo, desde pequeños adenomas hasta grandes carcinomas metastásicos.

Hasta hace poco tiempo no se sabía cuales eran los eventos moleculares que dan lugar a la iniciación y progresión de los tumores humanos. Con los avances en las técnicas de biología molecular se han podido detectar algunos de los genes que sufren alteraciones durante el proceso tumorigénico. En el caso del cáncer colorrectal se han detectado mutaciones puntuales en el gen de c-Ki-ras y p53, alteración de la expresión de c-myc, c-fos, c-Ki-ras y c-Ha-ras, amplificación del gen de c-myc y c-myb y pérdidas alélicas múltiples. Se ha tratado de correlacionar cada una de estas alteraciones con la edad, sexo, grado de diferenciación, estadio de Dukes, supervivencia y recurrencia. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado una correlación clara que pueda servir para pronosticar el resultado de la enfermedad.

Todos estos estudios se han llevado a cabo en diversas partes del mundo, pero sólo en una (Morillón, 1992) se ha estudiado la expresión de algunos oncogenes en la población mexicana, por lo cual se considera necesario llevar a cabo un estudio en el que se determine el grado de expresión de los oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras y del gen supresor de tumores p53 y se trate de correlacionar con la edad, sexo, grado de diferenciación, localización y estadio de Dukes que presentan diferentes tumores de pacientes de origen mexicano.

2. OBJETIVOS.

1.- Determinar la expresión de los oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras y del supresor tumoral p53 en cáncer colorrectal humano y compararlo con la expresión que presentan en el tejido colorrectal normal.

2.- Correlacionar la expresión de estos oncogenes y del supresor tumoral con el sexo, edad, grado de diferenciación, estadio de Dukes y localización que presentan dichos tumores.

3. ANTECEDENTES.

3.1. CONCEPTO DE CÁNCER.

El crecimiento celular es un proceso altamente regulado que responde a las necesidades específicas del cuerpo. En un animal joven, la multiplicación celular excede a la muerte celular, por lo cual el tamaño del organismo aumenta. En un adulto el proceso de multiplicación y muerte están balanceados para producir un estado estable. Para algunos tipos de células adultas la renovación es rápida: las células intestinales, así como cierto tipo de células blancas sanguíneas, tienen una vida media de unos cuantos días antes de que mueran y sean reemplazadas. En cambio, las células rojas sanguíneas tienen una vida media aproximada de 100 días, las células sanas del hígado mueren muy raramente, y en los adultos, hay una pérdida lenta de neuronas ya que son reemplazadas muy lentamente.

Ocasionalmente se rompen los rigurosos controles que regulan la multiplicación celular y una célula empieza a crecer y a dividirse, a pesar de que el organismo no necesite más células de este tipo. Cuando las descendientes de esta célula heredan la propensión de crecer sin responder a la regulación, el resultado es una clona de células capaces de expandirse indefinidamente. Finalmente, una masa llamada tumor puede ser formada por esta clona de células no deseadas. Ya que los tumores pueden tener un efecto devastador en los organismos que los padecen se han llevado a cabo intensas investigaciones para entender como se forman. Estos eventos genéticos pueden ser tanto heredados a través de los gametos, así como por cambios en el DNA de las células somáticas. El tipo principal de cambios es la alteración de dos tipos de genes preexistentes, los proto-oncogenes y los genes

supresores de tumores. Los productos mutados de estos genes causan el crecimiento celular inapropiado.

Los tumores surgen con gran frecuencia, especialmente en los organismos más viejos. Sin embargo, la mayoría no pone en peligro la vida del organismo ya que el tumor se encuentra localizado. Dichos tumores son llamados benignos. Los tumores se convierten en una amenaza para la vida del organismo cuando éstos se diseminan por el cuerpo. Dichos tumores son llamados malignos y son la causa del cáncer.

Las principales características que diferencian a los tumores malignos de los benignos son su invasividad y su capacidad de diseminación. Los tumores malignos no permanecen localizados y encapsulados; en cambio, invaden el tejido circundante, penetran en el sistema circulatorio del cuerpo y establecen áreas de proliferación distantes al sitio original de aparición. La diseminación de células tumorales y crecimiento en áreas secundarias es llamada metástasis.

3.2 CÁNCER COLORRECTAL.

3.2.1. ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.

Desde hace mucho tiempo se ha pensado que la tumorigénesis es un proceso multietapas, sin embargo, solamente hasta hace poco tiempo ha sido posible identificar los eventos moleculares que dan lugar a la iniciación y progresión de los tumores humanos. Los tumores colorrectales proveen un excelente sistema en el cual se puede buscar y estudiar las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo del cáncer humano ya que se pueden conseguir tumores en diferentes estadios de desarrollo, desde pequeños adenomas hasta grandes carcinomas metastásicos. Más aún, tanto factores hereditarios como ambientales contribuyen al desarrollo de la neoplasia colorrectal, permitiendo el estudio de alteraciones genéticas tanto heredadas como espontáneas.

Los tumores malignos del colon y del recto se pueden clasificar en primarios y metastásicos. Los tumores malignos primarios se originan en el colon y en el recto. Los metastásicos son los que: 1) se han propagado por invasión directa hasta esas porciones del intestino grueso desde lugares distantes o bien desde zonas vecinas o 2) afectan el colon y el recto como parte de un proceso diseminado. Los tumores malignos que aparecen en esta

zona con más frecuencia son los primarios, y dentro de este grupo el más común es el adenocarcinoma.

3.2.2. EPIDEMIOLOGIA.

El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por cáncer después del cáncer de pulmón (Takahashi et al., 1991) La frecuencia de esta enfermedad en todo el mundo parece estar relacionada con un alto grado de industrialización y estándares socioeconómicos. La prevalencia de este carcinoma es elevada en Norteamérica, Europa occidental y Nueva Zelanda , es intermedia en Europa oriental y baja en Sudamérica, Africa y Asia (Takahashi et al., 1991; Winawer et al., 1990). Estados Unidos posee una de las tasas más elevadas de cáncer colorrectal del mundo. En México, el cáncer colorrectal es la cuarta causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres. En hombres, la primera causa de muerte por cáncer es el cáncer pulmonar, en segundo lugar el cáncer de prostata y en tercer lugar el linfoma. En mujeres, el primer lugar lo ocupa el cáncer de cervix, el segundo el cáncer de mama y el tercer lugar lo ocupa el linfoma (Datos del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, comunicación personal Dr. Luna). Se ha comprobado que las personas que emigran a una determinada región geográfica adquieren el riesgo de padecer cáncer colorrectal que existe en dicha región . Lo anterior queda demostrado por la observación de una prevalencia más elevada de cáncer colorrectal entre los negros que emigraron a Estados Unidos que entre aquellos que permanecieron en Africa. La frecuencia con la que aparece el cáncer colorrectal es más elevada en las zonas urbanas que en las rurales, y en las personas de raza blanca que en las personas de raza negra (Winawer et al., 1990).

La distribución geográfica del cáncer rectal es muy similar a la del cáncer del colon. Existe una predominancia del sexo masculino entre los que padecen cáncer rectal, mientras que en el cáncer de colon la proporción mujer-varón es aproximadamente igual. Actualmente, alrededor del 55% de los cánceres de colon tienen lugar en los 25 cm distales del intestino, mientras que hace 30 años el porcentaje ascendía a un 75% . La incidencia de cáncer colorrectal ha permanecido relativamente estable en algunos países, como Inglaterra y Gales, mientras que ha aumentado lentamente en otros, como Estados Unidos y Dinamarca. En Japón, se ha producido un aumento sustancial en las últimas décadas, debido probablemente a la occidentalización de la dieta.

Existen ciertas alteraciones en las tasas de incidencia del cáncer colorrectal dentro de las diferentes poblaciones. Aparte de las variaciones debidas a la raza y al lugar de

residencia, existen también otras diferencias relacionadas con los diversos grupos religiosos. Así, por ejemplo, el riesgo existente entre los judíos es mayor que el de la población general, siendo menor entre los adventistas del séptimo día y los mormones. Estas variaciones pueden tener su origen en los diferentes regímenes dietéticos.

3.2.3. ETIOLOGIA.

Parece ser que factores tanto genéticos como ambientales son importantes en el desarrollo del cáncer colorrectal. Se han determinado las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con cáncer colorrectal desarrollado por factores genéticos principalmente. Este tipo de cáncer se desarrolla fundamentalmente en el lado derecho del colon, en individuos jóvenes y por lo general es multifocal. Este tipo de carcinomas está asociado con la coexistencia de adenomas. En cambio, el cáncer colorrectal que se desarrolla principalmente por factores ambientales se encuentra localizado en el lado izquierdo del colon mayoritariamente. En los países en los que hay una baja incidencia de cáncer colorrectal los factores genéticos predominan como factor causante de esta enfermedad, mientras que en los países con alta incidencia los factores ambientales son la principal influencia etiológica.

3.2.4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

Varios investigadores han explorado el papel que juegan los factores alimenticios en la etiología del cáncer colorrectal. En estudios realizados en Estados Unidos (Takahashi et al., 1991) se demostró que no existe una correlación entre el cáncer de colon y el consumo de tabaco. Sin embargo, sí existe una correlación entre una dieta alta en carbohidratos refinados y el cáncer colorrectal. Esta afirmación se basa en el hecho de que el cáncer colorrectal es prácticamente inexistente en la población negra de la mayor parte de África. El alto contenido en fibra en la dieta de los africanos resulta en deposiciones voluminosas y tiempos de tránsito cortos, en contraste a la población blanca en la que las deposiciones son de pequeño tamaño y el tiempo de tránsito es alto. Así mismo, se ha demostrado una correlación entre el consumo de grasas y la incidencia de cáncer de colon en todo el mundo. La cantidad de grasa proveniente de los alimentos determina la concentración fecal de esteroides ácidos y neutros, así como el de los ácidos biliares. La flora intestinal metaboliza estos compuestos en carcinógenos o cocarcinógenos. Estudios metabólicos en humanos han demostrado un incremento en la degradación y excreción de esteroides neutros y ácidos

biliares en las poblaciones de alto riesgo con una dieta de tipo occidental en comparación de las personas con bajo riesgo de padecer cáncer. En este grupo de alto riesgo también se ha observado una mayor actividad de β -glucuronidasa en las bacterias fecales. Ya que muchos metabolitos tumorigénicos son excretados en la bilis como conjugados de glucurónidos, el papel de las bacterias colónicas en los grupos de alto riesgo puede ser el de la hidrólisis activa de tales conjugados. Varios estudios han demostrado que las dietas altas en carne resultan en niveles incrementados de ácidos biliares y metabolitos de colesterol en las deposiciones, así como un incremento en la actividad de glucuronidasa en las bacterias con respecto a las dietas sin carne y bajas en grasas.

Se ha demostrado que varias enzimas fecales, además de la β -glucuronidasa, presentan diferente actividad entre la población de alto riesgo y la de bajo riesgo. Se ha visto un aumento en la actividad de 7-hidroxisasa, la cual convierte los ácidos biliares primarios en secundarios, en los pacientes con cáncer colorrectal comparados con los controles. Resultados similares se encontraron para la colesterol deshidrogenasa, una enzima que convierte el colesterol en coprostanol en el contenido colónico.

También existen elementos, que constituyen parte de la dieta, los cuales tienen un efecto protector en contra del desarrollo del cáncer colorrectal. Entre ellos se encuentra la fibra de frutas, verduras y cereales. El consumo de fibra, principalmente de frutas y verduras, ha sido asociado con una disminución en el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Se piensa que existen varios mecanismos por medio de los cuales la fibra disminuye el riesgo de padecer cáncer colorrectal. Los efectos de la fibra incluyen incremento en la masa fecal, aumento en la frecuencia de defecación, disminución en el tiempo de tránsito intestinal, dilución del contenido colónico, mayor crecimiento microbiano, disminución de la hidroxilación de los ácidos biliares y aumento en la producción de hidrógeno, metano, dióxido de carbón y ácidos grasos de cadena corta (Burnstein, 1993).

Así mismo se ha observado que el calcio puede disminuir el riesgo de la formación de pólipos y cáncer en pacientes de alto riesgo (Milsom, 1993). En ratones, el efecto irritante y tóxico de los ácidos biliares y ácidos grasos en la mucosa colónica puede ser reducida por la administración oral de calcio. Se cree que el mecanismo por medio del cual actúa el calcio es por medio del incremento de la adhesión celular y un decremento de la proliferación celular.

El consumo de ciertas vitaminas (D, A, C y E) y de micronutrientes tales como el selenio, dialil sulfuro o alil metil trisulfuro (ambos presentes en el ajo) puede estar asociado con una reducción en el padecimiento de cáncer colorrectal (Burnstein, 1993). Los mecanismos por medio de los cuales actúan son variados. Se ha visto que la vitamina D retarda el crecimiento de células cancerígenas humanas *in vitro* y disminuye los niveles de la ornitina descarboxilasa en las ratas. La vitamina A puede suprimir tumores de colon *in vitro*. La vitamina C puede suprimir la formación de compuestos nitrosos por medio de sus propiedades antioxidantes y disminuye el desarrollo de tumores después de la administración de carcinógenos. El selenio es un cofactor para el anticarcinógeno glutatión peroxidasa. El dialil sulfuro inhibe el daño nuclear inducido por carcinógenos y el alil metil trisulfuro incrementa la actividad de la glutatión S-transferasa, la cual puede inactivar carcinógenos.

3.2.5. INFLUENCIA DE EVENTOS EN LA SUPERFICIE DEL EPITELIO CELULAR.

En 1925, Crohn y Rosenberg por primera vez postularon la existencia de una relación entre la colitis ulcerativa y el cáncer colorrectal. Hoy en día, queda claro que la colitis ulcerativa predispone a los pacientes a padecer adenocarcinomas, especialmente cuando el proceso inflamatorio involucra totalmente al intestino grueso. Factores adicionales de riesgo para el desarrollo de carcinomas en pacientes con colitis ulcerativa son una duración de la enfermedad mayor de 7 a 10 años y aparición de la colitis a una edad más joven.

Por el momento, no se sabe con exactitud cual es la explicación para la asociación entre la colitis y el carcinoma. Puede estar relacionado con el proceso de inflamación crónica. Se cree que la displasia, que es el precursor de la lesión neoplásica del epitelio colónico, resulta por los ciclos repetitivos de inflamación y regeneración.

Una etiología similar puede explicar el ligero aumento del riesgo de padecer cáncer colorrectal en los pacientes que sufren colitis de Crohn. Se han encontrado displasias en la mayoría de cólores de pacientes con la enfermedad de Crohn que desarrollaron carcinomas.

Es altamente probable que los eventos que conducen al desarrollo de neoplasmas en pacientes con colitis ulcerativa o con la enfermedad de Crohn involucren factores ambientales, genéticos y nutricionales.

3.2.6. INFLUENCIA DE FACTORES HEREDITARIOS.

Existen ciertos síndromes hereditarios de poliposis los cuales aumentan el riesgo de presentar cáncer colorrectal. Entre éstos se encuentra la poliposis familiar. Este trastorno se caracteriza por la aparición de un gran número de pólipos adenomatosos a lo largo del colon y del recto. Su importancia con respecto al carcinoma de colon es enorme ya que todos los individuos afectados acaban padeciendo este tipo de cáncer. El síndrome de Gardner es una variante de la poliposis familiar. Este es un trastorno hereditario que se transmite como una característica autosómica dominante que muestra un alto grado de penetración. Aunque los pólipos adenomatosos se sitúan principalmente en el colon, en ocasiones aparecen en el estómago y en el intestino delgado. Los pólipos muestran una tendencia pronunciada a sufrir una transformación carcinomatosa. El síndrome de Turcot consiste en una poliposis de colon asociada a tumores malignos del sistema nervioso central. En otro tipo de poliposis, la poliposis juvenil, la distribución de los pólipos no suele ser tan extensa como en la poliposis familiar. Si bien los pólipos aparecen en forma indiscriminada a lo largo del conducto intestinal, lo más frecuente es que se localicen en el intestino grueso. Aunque estos polipos no son precancerosos, se han descubierto tumores adenomatosos en algunos pacientes que presentan este síndrome, y en algunos miembros de la familia afectada la incidencia de carcinomas de colon pueden ser superiores a lo normal. Otro tipo de síndrome es el cáncer de colon familiar sin pólipos. En este tipo de síndrome aumenta el número de familiares que presentan algún tipo de adenomas en relación a los grupos de control, lo que indica que los factores hereditarios desempeñan un papel muy importante en la génesis del cáncer colorrectal. Los criterios que se siguen para considerar un síndrome familiar de este tipo comprenden: 1) el aumento del número de cualquier tipo de adenocarcinoma en los sujetos afectados, especialmente de los carcinomas de colon y de endometrio, 2) la aparición del cáncer a una edad más precoz que la que se observa en ese mismo órgano en la población general y 3) la tendencia a que se manifiesten neoplasias malignas primarias múltiples en las personas afectadas.

3.2.7. ESTRATIFICACION DEL CÁNCER COLORRECTAL.

Los primeros sistemas de estratificación estaban basados en la factibilidad de una intervención quirúrgica. Los tumores colorrectales simples se clasificaban como operables e inoperables. Esta clasificación no proveía de información para pronosticar a cada paciente. En 1932, Sir Cuthbert Dukes realizó una clasificación de los estadios del cáncer colorrectal

para poder discriminar entre grupos de pacientes con alto o bajo riesgo de presentar recurrencia después de haber sido operados. La clasificación de Dukes ha sufrido varias modificaciones , y actualmente la que se usa es la siguiente:

ESTADIO	CARACTERISTICAS
A	Tumor limitado a la mucosa.
B1	Tumor que penetra la submucosa.
B2	Tumor que penetra la capa muscular y la serosa (en el caso del colon).
C1	Tumor que invade la capa muscular y 1-4 ganglios linfáticos.
C2	Tumor que invade la capa muscular y cinco o más ganglios linfáticos.
D	Tumor que invade la capa muscular, ganglios linfáticos y presenta metástasis a distancia.

Los pacientes cuyo tumor presenta un estadio A , que es la más baja, de acuerdo a la clasificación de Dukes tienen mayor frecuencia de sobrevivencia que aquellos que presentan un tumor en un estadio más avanzado (D) de acuerdo a esta clasificación. La Tabla 1 muestra los datos de sobrevivencia al cabo de cuatro años en un grupo de pacientes operados de carcinoma de colon y seguidos durante su evolución.

Tabla 1. Datos relativos a la tasa de sobrevivencia existente al cabo de cuatro años según el sistema de estratificación de Dukes modificado (Winawer et al., 1990).

ESTADIO DE DUKES	No. DE PACIENTES	RECURRENCIA	MUERTE
B2	228	40 (18%)	48 (21%)
C1	234	76 (32%)	90 (38%)
C2	100	57 (57%)	69 (69%)

3.3. ORIGEN MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL.

3.3.1. NATURALEZA CLONAL DEL CÁNCER COLORRECTAL.

Durante la década pasada las investigaciones en la carcinogénesis colorrectal se enfocaron en los cambios a nivel genético que dan lugar a los adenomas y carcinomas en pacientes con cáncer colorrectal tanto esporádico como heredado. Con los avances en las técnicas de biología molecular ha sido posible identificar pequeños cambios en ciertos cromosomas y evaluar las proteínas alteradas que resultan de dichos cambios.

Datos clínicos e histopatológicos sugieren que la mayoría de los tumores colorrectales malignos (carcinomas), si no es que todos, surgen de tumores benignos (adenomas) (Fearon y Vogelstein, 1990). Estudios de la composición clonal de tumores colorrectales humanos han demostrado que todos los tumores examinados, incluyendo los adenomas pequeños, tienen una composición monoclonal. Por lo tanto, los adenomas surgen de un pequeño número de células epiteliales, las cuales al sufrir una expansión clonal inician el proceso cancerígeno.

En un intento por entender las bases moleculares de esta expansión clonal varios investigadores han tratado de identificar las alteraciones somáticas presentes en los diferentes estadios del cáncer colorrectal. De particular interés son los cambios presentes en todas, o casi todas, las células neoplásicas estudiadas. La presencia de tales alteraciones sugieren que la alteración genética en sí proveyó a una célula con una ventaja de crecimiento, permitiéndole crecer más que las células circundantes y de esta forma se convierte en el tipo celular predominante en el tumor (expansión clonal).

Estas mutaciones pueden ser divididas en dos tipos: dominantes y recesivas. Las mutaciones dominantes expresan un fenotipo a pesar de que sólo se encuentre la mutación en uno de los dos genes de la célula. En las mutaciones recesivas se necesita que ambos alelos sufran la mutación para que se exprese el fenotipo. Las mutaciones dominantes involucran a los genes conocidos como proto-oncogenes y las mutaciones recesivas involucran a los genes supresores de tumores. Tanto los proto-oncogenes como los genes supresores de tumores se encuentran en todas las células. Los proto-oncogenes actúan normalmente como activadores del crecimiento y división celular, ejerciendo un efecto regulatorio positivo. La función normal de los genes supresores de tumores es el de frenar o disminuir el crecimiento celular, ejerciendo un efecto regulatorio negativo (Herrera et al., 1991). La

acción conjunta de estos dos tipos de genes mantiene bajo control el crecimiento y división celular, por lo cual, mutaciones en cualquiera de estos dos tipos de genes lleva al descontrol del crecimiento y, por lo tanto, al cáncer.

3.3.2. ALTERACIONES GENÉTICAS EN ONCOGENES.

Una familia de genes que frecuentemente se ve alterada en los tejidos tumorales es la de los proto-oncogenes. Estos genes son activados por mutaciones puntuales, amplificaciones, rearrreglos y por cambios en el nivel de expresión.

En tumores colorrectales una alteración somática importante es la mutación en el gen de c-Ki-ras. Se ha encontrado que aproximadamente el 50% de los carcinomas colorrectales y un porcentaje similar de adenomas de más de 1 cm en tamaño presentan mutaciones en el gen de ras (Capon et al., 1983; Forrester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988; Nagata et al., 1990; Sasaki et al., 1990; Capella et al., 1991). En contraste, tales mutaciones han sido identificadas en menos del 10% de los adenomas que tienen un tamaño menor a 1 cm. Los codones donde más frecuentemente ocurren mutaciones son los codones 12, 13 y 61. En los tejidos tumorales se ha visto que la glicina, que es codificada por el codón 12, es substituida por valina, ácido aspártico, serina o cisteína. La glicina del codón 13 es substituida por ácido aspártico principalmente. La mutación en el gen de ras podría ser el evento iniciador en un subgrupo de tumores colorrectales, y es más probable que progresen a carcinomas los adenomas con mutación en el gen ras que los adenomas que carecen de esta mutación. Alternativamente, las mutaciones en el gen de ras podrían no ser el evento iniciador en la mayoría de los tumores, esto ocurriría en una célula de un adenoma preexistente. Tal mutación entonces sería la responsable por la conversión de un pequeño adenoma a un adenoma de mayor tamaño y más displásico, a través de la expansión clonal de la célula con la mutación.

Se ha observado que el gen de c-Ki-ras no solamente se activa por mutaciones puntuales ya que se han encontrado cambios en su nivel de expresión en los tumores con respecto al tejido normal adyacente (Gallick et al., 1985; Monnat et al., 1987). En aproximadamente el 50% de los tumores primarios estudiados se ha encontrado un aumento en la expresión (2-10 veces) de c-Ki-ras. Este aumento en la expresión no es debida a amplificaciones del gen o rearrreglos. El 88% de los tumores que presentaron aumento de la expresión estaban clasificados como Dukes B y C. En contraste el 80% de los tumores clasificados como Dukes D no presentaron aumento en la expresión de c-Ki-ras. Estos datos

sugieren que la elevación de la expresión de ras puede ser un evento común en las primeras etapas del tumor y a medida que evoluciona se presentan niveles menores de este gen. Esta hipótesis ha sido apoyada por el descubrimiento que en el 100% de metástasis de tumores colorrectales primarios se ha observado una disminución en la expresión de este gen (Gallick et al., 1985).

En tumores colorrectales primarios se ha observado la activación de otros oncogenes entre los que se encuentran c-fos, c-myc, c-Ha-ras y c-myb (Erisman et al., 1985; Yokota et al., 1986; Monnat et al., 1987; Erisman et al., 1988; Nagai et al., 1992). Se ha observado un aumento en la expresión de los oncogenes c-fos en el 17% - 43% de los tumores (Nagai et al., 1992; Monnat et al., 1987), de c-myc en el 30% - 70% de los tumores (Monnat et al., 1987; Nagai et al., 1992; Erisman et al., 1985; Erisman et al., 1988) y de c-Ha-ras en el 14% - 39% de los tumores (Monnat et al., 1987; Nagai et al., 1992). La expresión de c-fos se ha visto incrementada de 2 a 8 veces, la de c-myc 12 a 40 veces y la de c-Ha-ras de 2 a 4 veces. Así mismo, se ha observado la amplificación de los genes c-myc, c-myb y en muy pocos casos c-fos (Nagai et al., 1992; Yokota et al., 1986). Muchos autores han tratado de relacionar estas alteraciones con la edad, sexo, estadio de Dukes, grado de diferenciación, tamaño del tumor, supervivencia y recurrencia; sin embargo, no han encontrado una correlación clara entre estos parámetros, por lo cual estas alteraciones moleculares no han podido ser utilizadas para poder pronosticar el resultado de la enfermedad.

En los siguientes capítulos se hablará de la estructura y función de estos oncogenes.

3.3.3. PERDIDAS DE ALELOS Y GENES SUPRESORES DE TUMORES.

En las neoplasias colorrectales se ha identificado la pérdida de regiones específicas de ciertos cromosomas. Usualmente se pierde uno de los dos alelos presentes en las células normales. Estas pérdidas alélicas han sido interpretadas como evidencia de que las regiones afectadas contienen genes supresores de tumores, cuyos productos normalmente regulan el crecimiento de manera negativa y por lo tanto suprimen indirectamente el desarrollo de la neoplasia.

Estudios previos de pérdidas alélicas en tumores de pacientes con predisposición heredada a ciertos tipos particulares de tumores, como retinoblastoma y neurofibromatosis tipo II, se enfocan en los cromosomas que se sabe que contienen el locus que se pierde en dicha enfermedad. La poliposis adenomatosa familiar (FAP), la cual se caracteriza por la

formación de cientos de adenomas colorrectales, es un síndrome autosómico dominante. El locus ligado a esta enfermedad ha sido localizado en el cromosoma 5q. En pacientes sin poliposis las pérdidas alélicas del cromosoma 5q se observan en 20% - 50% de los carcinomas colorrectales y en aproximadamente el 30% de los adenomas colorrectales. Sin embargo, en los adenomas de pacientes con poliposis adenomatosa familiar la pérdida alélica del cromosoma 5q es rara (Fearon y Vogelstein, 1990). Por lo tanto, a pesar de que cada adenoma, en el paciente con poliposis, surge por expansión clonal, esta expansión no está asociada con la pérdida de la región del cromosoma ligada a esta enfermedad. Esta observación contrasta con el patrón de pérdidas alélicas de otros síndromes heredados que predisponen al paciente a la formación de tumores; las implicaciones de este hallazgo se discutirán en el siguiente apartado.

Otra pérdida alélica que se observa en más del 75% de los carcinomas colorrectales es la pérdida de una gran porción del cromosoma 17p, ya sea por medio de pérdida cromosómica o recombinación mitótica. Sin embargo, dicha pérdida es poco frecuente en adenomas de cualquier tamaño (Fearon y Vogelstein, 1990). Más aún, en varios pacientes la pérdida alélica del cromosoma 17p ha estado asociada con la progresión de tumores individuales de adenomas a carcinomas. Se ha identificado en esta región del cromosoma 17p al gen llamado p53. Así mismo, se ha visto que en algunos tumores colorrectales que perdieron un alelo 17p, la proteína del gen de p53 que aún se conserva tiene mutaciones debido al cambio de a.a. Por lo tanto, parece ser frecuente en tumores colorrectales la mutación puntual de un alelo del gen de p53 acoplado con la pérdida del otro alelo. Más aún, la evidencia que ha proporcionado las transformaciones in vitro indican que p53 tipo silvestre puede funcionar como un gen supresor de tumores (Zambetti y Levine, 1993). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que el gen de p53 tipo silvestre inhibe el crecimiento de tumores colorrectales.

Otra región que sufre pérdidas alélicas frecuentemente en tumores colorrectales es el cromosoma 18q, el cual es perdido en más del 70% de los carcinomas y en casi el 50% de los adenomas tardíos (Fearon y Vogelstein, 1990). La región que comunmente se pierde se ha localizado en el cromosoma 18q y se piensa que en esa zona se encuentra un gen supresor de tumores. Este gen, llamado DCC (por "deleted in colon cancer"), codifica para una proteína con significativa homología con la familia de moléculas de adhesión. El gen DCC se ha encontrado expresado en la mucosa colónica normal, pero su expresión se ha encontrado reducida o ausente en la mayoría de los carcinomas colorrectales. Por lo tanto, este gen puede jugar un papel importante en el desarrollo de tumores colorrectales,

probablemente a través de la alteración de las interacciones entre célula-célula o célula-matriz extracelular.

3.3.4. GENES SUPRESORES DE TUMORES Y MODELO RECESIVO.

Se ha supuesto que los genes supresores de tumores actúan recesivamente a nivel celular, de tal forma que tanto la copia paterna como la materna deben de ser inactivadas para que la función supresora de tumores sea eliminada. Esta hipótesis ha sido apoyada por los estudios hechos con el gen de retinoblastoma. Sin embargo, varias observaciones sugieren que este modelo recesivo para los genes supresores de tumores debe de ser ampliado.

En general, se piensa que los síndromes de predisposición resultan por la inactivación en la línea germinal de una copia del gen supresor de tumores (un único gen en cada síndrome). Si la premisa anterior es correcta, así como la hipótesis recesiva, entonces se esperaría que los tumores que se desarrollan en estos pacientes tuvieran inactivado el alelo restante de tipo silvestre en el locus del gen supresor. En efecto, en la forma heredada de retinoblastoma y en otros síndromes heredados, el alelo tipo silvestre se pierde. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estudios de adenomas de pacientes con poliposis adenomatosa familiar no revelan pérdida de la región cromosómica ligada a este síndrome (Fearon y Vogelstein, 1990).

En los tumores esporádicos, el modelo recesivo predice que dos eventos genéticos son necesarios para generar un efecto fenotípico. El primer evento inactiva un alelo donde se encuentra el gen supresor de tumores y el segundo evento inactiva el otro alelo. Estas inactivaciones pueden ser por mutaciones localizadas, recombinación mitótica o por pérdida cromosomal. Este escenario presenta una dificultad inherente con el modelo recesivo para tumores esporádicos. La expansión clonal de las células con una alteración genética puede ocurrir solamente si un efecto fenotípico resulta de la alteración genética. Si la mutación somática de un alelo del gen supresor de tumores no produce una ventaja en el crecimiento, entonces sería difícil tener una gran cantidad de células con esta mutación para tener una probabilidad razonable para que ocurra la inactivación del segundo alelo.

Este dilema puede ser resuelto si las mutaciones de algunos genes supresores de tumores afectan el crecimiento a pesar de la presencia de un alelo en buenas condiciones. Datos recientes indican que las mutaciones del gen de p53 podrían estar actuando de esta

forma (Zambetti y Levine, 1993). El gen mutado de p53 puede cooperar con ras para transformar células de roedor *in vitro*, aún cuando dichas células expresen el gen de p53 tipo silvestre. Por lo tanto, a nivel celular, la mutación del gen de p53 puede funcionar más como una mutación dominante negativa que como una recesiva. Este efecto dominante negativo puede ser explicado en parte por la oligomerización de los productos del gen de p53. El producto mutado del gen de p53 puede inactivar el producto del gen tipo silvestre por medio de la unión a él y previniendo su asociación normal con otros constituyentes celulares.

Con estos antecedentes, parecería probable que un gen mutado de p53 en una célula tumoral colorrectal puede proveer de una ventaja de crecimiento que lleva a la progresión tumoral, aún en la presencia de un alelo de p53 tipo silvestre. La pérdida subsecuente del alelo de p53 tipo silvestre se asocia frecuentemente con la progresión de adenoma a carcinoma, y probablemente amplifica la ventaja de crecimiento dada por la mutación. El descubrimiento de tumores colorrectales que presentan este estado intermedio apoyan este modelo (Nigro et al., 1989). Este tumor contenía un alelo de p53 tipo silvestre y un alelo mutado, ambos expresados en RNA en aproximadamente la misma proporción. Se encontró p53 mutado en todas las células del tumor, muy probablemente como el resultado de la expansión clonal de la célula que sufrió la mutación original. Así mismo, los autores proponen que alguna de estas células tumorales, de no haber sido removido el tumor, eventualmente habría perdido el alelo tipo silvestre por medio de pérdida alélica y, por un proceso de expansión clonal, se convertiría en el tipo celular predominante. También piensan que la expansión clonal de la célula con la pérdida del alelo tipo silvestre estaría acompañado de la progresión tumoral. Esta hipótesis está apoyada por estudios que demuestran que carcinomas colorrectales con pérdida alélica del cromosoma 17p son más agresivos que aquellos que no han experimentado esta pérdida (Fearon y Vogelstein, 1990).

Parece ser que otros genes supresores de tumores tampoco se apegan al modelo recesivo. Mutaciones de un alelo pueden ser suficientes para proveer un fenotipo alterado, probablemente a través de un efecto dominante negativo. Alternativamente, el nivel de expresión de algunos genes supresores de tumores puede ser crítico; la expresión reducida de la proteína correspondiente puede alterar algún aspecto de la regulación del crecimiento. Por ejemplo, la pérdida de un alelo que contiene un gen que codifica para una proteína, que es un receptor en la superficie celular que normalmente regula negativamente el crecimiento, puede llevar a un control deficiente de la proliferación del epitelio colónico. El gen DCC, descrito anteriormente, puede encajar en esta descripción. La función biológica de algunas

moléculas de adhesión celular es crítica. Un decremento del doble de la densidad superficial de tales moléculas puede resultar en una reducción de la adhesión celular. Ya que es probable que el gen DCC represente una molécula de adhesión celular, la reducción de su expresión en las células epiteliales colorrectales puede dar lugar a una adhesión alterada y una disminución de señales que restringen el crecimiento asociadas con tal adhesión. Lo anterior puede dar lugar a una expansión clonal, aún cuando el alelo restante no haya sufrido una mutación y esté expresándose en estas células.

A pesar de que estudios futuros son obviamente necesarios para determinar cuales genes supresores de tumores tienen un efecto fenotípico cuando solo un alelo es mutado o perdido, los descubrimientos mencionados anteriormente sugieren que los conceptos de dominantes negativos y efectos de dosis deben de ser incluidos en la definición de los genes supresores de tumores.

3.3.5. PERDIDAS ALELICAS MULTIPLES EN TUMORES COLORRECTALES.

En carcinomas colorrectales se puede observar la pérdida de muchos otros alelos además de las pérdidas alélicas de los cromosomas 5q, 17p y 18q (Vogelstein et al., 1989). Regiones de los cromosomas 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q y 22q fueron perdidos en 25% - 50% de los casos estudiados, y se observaron pérdidas de cada uno de los brazos de los cromosomas restantes en al menos un caso (Figura 1). La frecuencia de pérdidas cromosomales enfocado desde la perspectiva de tumores individuales es menos compleja, ya que cada tumor pierde, en promedio, entre cuatro y cinco brazos cromosómicos. El grupo de pacientes con tumores que presentan mayor número de pérdidas alélicas que la media tienen un pronóstico considerablemente peor que los otros pacientes, a pesar que el tamaño y el estadio clínico del tumor primario sean muy similares en ambos grupos.

La distribución de las pérdidas alélicas de la Figura 1 puede reflejar dos procesos. Primero, algunas regiones cromosómicas, particularmente aquellas de los cromosomas 17p y 18q, son perdidas en la mayoría de los carcinomas colorrectales, muy probablemente por contener genes supresores que son el "blanco" de la pérdida. Segundo, muchas otras regiones son perdidas de manera mas heterogénea, con cada pérdida encontrada solamente en una minoría de los tumores. Hay dos posibles explicaciones para estas pérdidas alélicas adicionales en tumores individuales. Una hipótesis es que algunas de estas pérdidas pueden tener un efecto no específico en el fenotipo de las células, pero pueden haber surgido

coincidentalmente con otras alteraciones genéticas sobre las cuales la selección pudo actuar, probablemente en un evento mitótico complejo en el cual se pierden varios cromosomas. Alternativamente, puede haber varios genes supresores de tumores presentes a lo largo de todo el genoma, y cada una de las regiones cromosómicas perdidas puede contener uno de estos genes. Esta última hipótesis puede no ser tan lejana como parece, ya que estudios en varios tipos de líneas celulares sugieren que los genes supresores de tumores residen en varios cromosomas diferentes (Fearon y Vogelstein, 1990). La heterogeneidad en el patrón de las pérdidas alélicas de los tumores individuales puede ser el responsable de la diversidad observada en las propiedades de los tumores colorrectales de los diferentes pacientes. Los tumores con un subgrupo específico de genes supresores alterados puede comportarse diferente de aquellos con otro tipo de alteraciones.

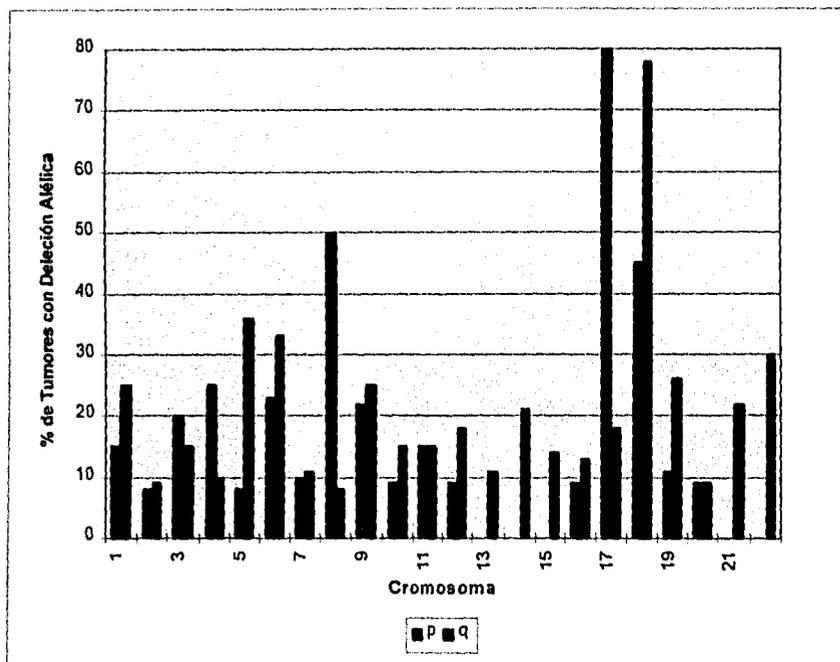


Figura 1. Frecuencia de deleciones alélicas en carcinomas colorrectales (Fearon y Vogelstein, 1990).

3.3.6. LA ACUMULACION DE CAMBIOS, MAS QUE EL ORDEN, ES LO MAS IMPORTANTE.

Vogelstein y Fearon, con todos los datos acumulados hasta este momento han propuesto un modelo para el desarrollo de los tumores colorrectales (Figura 2) (Fearon y Vogelstein, 1990). Datos histopatológicos y clínicos sugieren que la mayoría de los carcinomas colorrectales surgen de adenomas, que gradualmente progresan a través del incremento en tamaño, displasia y adquisición de morfología vellosa. A pesar de que el proceso de la progresión del adenoma es un continuo, es posible que resulte de ondas sucesivas de expansión clonal. Tres estadios discretos de la formación del adenoma están señalados en la Figura 2. Los autores señalaron dos procesos, que sin lugar a duda son complejos, la progresión a carcinoma y después a metástasis, como que ocurrieran en un mismo paso en un intento de mantener el modelo lo más simple posible. El proceso de neoplasia colorrectal señalado ocurre en un período medido en décadas.

Los datos obtenidos de pacientes con y sin poliposis, sugieren que la tumorogénesis es precedida por una hiperproliferación celular diseminada. En pacientes con poliposis, y probablemente en otros pacientes, la proliferación puede ser inducida por la pérdida o inactivación del gen de la poliposis adenomatosa familiar (FAP) en el cromosoma 5q. Una de estas células hiperproliferativas puede dar lugar, por expansión clonal, a un adenoma pequeño. No son claros cuales son los eventos genéticos responsables por la transición de hiperplasia a neoplasia, pero como se mencionó anteriormente, parece que no involucra la pérdida del alelo restante del gen de FAP. Es probable que sean heterogéneos los eventos genéticos que controlan esta transición e involucran la mutación del gen de ras en algunos tumores, la mutación de p53 en otros y la mutación en el cromosoma 18q u otro cromosoma en los tumores restantes.

El momento en el cual se da la mutación del gen de ras y la pérdida de los cromosomas con respecto a los diferentes estadios de la tumorogénesis colorrectal está indicado en la Figura 2. A pesar de que las alteraciones ocurren usualmente en fases características de la tumorogénesis colorrectal, se piensa que lo más importante en la progresión de este tumor es la acumulación progresiva de cambios, más que el orden en que ocurren uno con respecto al otro. Los argumentos que apoyan esta hipótesis son los siguientes. Primero, no se ha encontrado ninguna alteración que se encuentre restringida a un estadio particular de la tumorogénesis. Por ejemplo, la delección del cromosoma 17p se observa usualmente en carcinomas o en adenomas de estadio tardío, pero se ha encontrado

que algunos pequeños adenomas ya han perdido este cromosoma. Segundo, en varios casos ha sido posible estudiar diferentes estadios de la neoplasia en el mismo tumor, aislando DNA tanto de la región adenomatosa como carcinomatosa (Vogelstein et al., 1988). El que las regiones carcinomatosas surgieran de las regiones adenomatosas ha sido demostrado en varios casos en los cuales se ha observado la misma mutación en ras en ambas regiones. Sin embargo, en todos los casos, la región carcinomatosa contenía una alteración no encontrada en la región adenomatosa. La ocurrencia de alteraciones genéticas en estas muestras ha sido, en general, de acuerdo con el orden preferencial mostrado en la Figura 2; sin embargo, se han encontrado algunos tumores que no siguen este orden. Por ejemplo, en un caso, la delección del cromosoma 17p antecedía la delección del cromosoma 5q y 18q; en otro caso, la delección del cromosoma 18q precedió a la mutación del gen ras. Por lo tanto, a pesar de que existe un orden preferente para las alteraciones genéticas en el cancer colorrectal, los datos sugieren que la acumulación progresiva de estas alteraciones es la característica más consistente en la progresión de los tumores colorrectales.

Es importante notar que se ha encontrado que las cuatro alteraciones discutidas anteriormente (mutación del gen ras, delección de los cromosomas 5q, 17p y 18q) ocurren a frecuencias similares en diversas poblaciones, tanto étnicas como geográficas, que presentan una variada incidencia de cáncer colorrectal (Vogelstein et al., 1988). Así mismo, estas alteraciones genéticas se han observado en la misma proporción (con la excepción de la pérdida del cromosoma 5q en los adenomas colorrectales) en los tumores colorrectales de pacientes con y sin poliposis (Vogelstein et al., 1988). En conclusión, los datos sugieren que existe un mecanismo molecular común para el desarrollo del cancer colorrectal, sin importar los factores hereditarios o ambientales a los que se está expuesto.

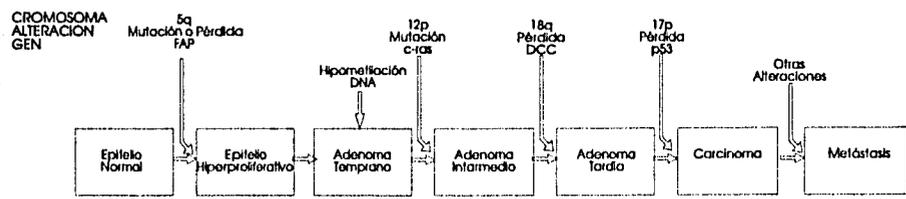


Figura 2. Modelo de las alteraciones genéticas durante la progresión de los tumores colorrectales (Fearon y Vogelstein, 1990).

3.4. C-MYC

3.4.1. ESTRUCTURA.

El gen de c-myc consta de tres exones. La región que codifica para la proteína empieza en el primer codón de iniciación ATG ubicado cerca del extremo 5' del exon dos y se extiende hasta dos terceras partes del exon tres. Esto nos indica que la región del mRNA que codifica a la proteína está flanqueada por una larga secuencia líder y por una secuencia "trailer". Estas secuencias están involucradas en la regulación de la expresión y en la estabilidad del RNA de c-myc (Eisenman, 1989).

La proteína de c-myc (c-Myc) es una fosfoproteína nuclear con corta vida media (20-30 minutos), y de 49 kDa de masa molecular (Evan, 1990; Kelly, 1986; Cole, 1986). Tanto en el extremo carboxi terminal como en el amino terminal existen regiones importantes para la función de la proteína. Los 85 a.a. del extremo carboxi terminal comparte una secuencia significativamente similar con dos familias diferentes de factores de transcripción, la familia de los factores de transcripción que contienen una región de a.a. básicos seguido por un motivo hélice-giro-hélice (bHLH) y la familia de los factores de transcripción que contienen una región de a.a. básicos seguido por un motivo denominado "zipper" de leucina (bZip) (Blackwood and Eisenman, 1991). La familia que contiene el dominio bHLH incluye alrededor de 60 proteínas de vertebrados, levaduras, plantas e insectos, de las cuales la mayoría se localizan en el núcleo, se unen a una secuencia específica del DNA y funcionan como reguladores de la transcripción. Estudios de varias proteínas bHLH han demostrado que el motivo hélice-giro-hélice regula la formación de homo y heterodímeros, lo cual permite que se forme una superficie de contacto con el DNA por medio de la región básica. La proteína de c-myc difiere de las de la familia bHLH en que posee otra α -hélice, que contiene varios residuos de leucina ("zipper" de leucina). Esta α -hélice se encuentra adyacente al dominio bHLH hacia el extremo carboxi terminal. Esta estructura es característica del dominio de dimerización de la familia bZip. Las proteínas de esta familia son reguladoras de la transcripción. El arreglo de a.a. no polares (leucinas) forma una cara hidrofóbica a lo largo de la hélice anfipática, lo cual facilita la asociación específica de proteínas bzip a través de interacciones hidrofóbicas. La dimerización de estas proteínas es crítica para la unión al DNA.

3.4.2. FUNCION.

Se ha propuesto que c-Myc puede funcionar tanto como activador de la transcripción como en la replicación del DNA (Kelly, 1986)

Se ha observado que el extremo amino terminal actúa como activador de la transcripción siempre y cuando se una a un dominio de una proteína de levadura o de procarionte el cual se una al DNA.

Recientemente se ha reportado (Blackwood and Eisenman, 1991) que c-Myc puede formar un dímero con otra proteína nuclear, Max, la cual, al igual que c-Myc, contiene un dominio compuesto por una región de a.a. básicos seguido por una región hélice-giro-hélice-"zipper" de leucina (bHLH-Zip). Este dominio se encuentra a cincuenta residuos del extremo carboxi terminal. La función de dimerización de ambas proteínas reside en el dominio HLH-Zip, mientras que la región básica se encarga de llevar a cabo la unión al DNA. El complejo Myc-Max se une a una secuencia específica del DNA la cual podría regular la transcripción de los genes que contengan en su región promotora dicha secuencia.

3.4.3. EXPRESION DEL GEN DE C-MYC.

Las células no transformadas, tales como fibroblastos o linfocitos en cultivo, solamente proliferan en respuesta a factores de crecimiento específicos. En la ausencia de dichos factores, las células no transformadas no se dividen y permanecen en estado quiescente. Al suplementar dichas células con factores de crecimiento se les induce a re-entrar en el ciclo celular y posteriormente proliferar. Esta re-entrada en el ciclo celular está acompañada por una rápida inducción de una familia de genes que se cree que están involucrados en el control del proceso mitogénico.

Los proto-oncogenes c-fos, c-jun y c-myc, entre otros, se encuentran en esta familia de genes "tempranos" (Ratner et al., 1985; Kelly, 1986; Cole, 1986). La inducción rápida de estos genes después de administrar los factores de crecimiento sugiere que están activos en las primeras etapas del ciclo celular.

c-myc difiere en varios aspectos del resto de los otros genes que responden rápidamente a los mitógenos. c-myc es inducido tiempo después que los otros genes tempranos; su expresión está ligada con células proliferativas, mientras que la expresión de

muchos de los otros genes tempranos también puede ser inducido por una gran variedad de estímulos no mitogénicos; frecuentemente es expresado por períodos largos, mientras que la mayoría de los genes tempranos solamente son expresados temporalmente. Todas estas peculiaridades sugieren un papel único para c-myc en la proliferación celular.

Se han realizado análisis cuantitativos (Evan, 1990) de los niveles de la proteína de c-myc en fibroblastos no transformados durante la inducción mitogénica. En fibroblastos quiescentes hay un poco menos de 300 moléculas de c-Myc. Después de suplementar el medio con factores de crecimiento, los niveles de c-Myc aumentan hasta un máximo de 10,000 moléculas por célula en las siguientes dos horas. Tiempo después, en la etapa tardía de G1, los niveles de la proteína disminuyeron a 4,000 moléculas por célula. Esta cantidad se mantiene constante a lo largo del ciclo celular mientras que las células se mantengan en la fase logarítmica de crecimiento. En todo este tiempo se mantiene invariable el corto tiempo de vida media tanto del mRNA como de la proteína. Si se remueven los factores de crecimiento del cultivo de células no transformadas, estas dejarán de crecer y re-entrarán a un estado quiescente (G0). Al mismo tiempo se observa un decremento rápido de los niveles del mRNA y de la proteína de c-myc.

Los fibroblastos no transformados también pueden entrar al estado quiescente por inhibición por contacto. Esta inhibición por contacto es acompañada por un decremento en los niveles de c-Myc.

Estudios de diferenciación también sugieren que c-myc juega un papel importante en el control de la entrada de las células a estado quiescente (Evans, 1990; Ratner et al., 1985; Kelly, 1986). Varias líneas celulares se diferencian en respuesta a diversos agentes químicos. Dicha diferenciación casi siempre es acompañada de una represión de la expresión de c-myc. Así mismo, una sobreexpresión forzada de c-myc previene que las células afectadas se diferencien completamente.

Con base en todo lo anterior se concluye que el papel que juega c-myc en las células normales podría ser uno de los que determinara el que las células continúen o dejen de proliferar. En este modelo, la represión de la expresión de c-myc da lugar a una rápida desaparición de c-Myc y actúa como una señal para que la célula entre al estado quiescente, mientras que la expresión sostenida de c-myc mantiene a las células proliferando.

En células transformadas, la expresión de c-myc se encuentra en niveles elevados respecto a las células no transformadas (Evan, 1990). Estas células no responden a factores de crecimiento. Al privarlas de dichos factores continúan proliferando, no muestran una disminución en la expresión de c-myc y son incapaces de entrar en estado quiescente. La inhibición por contacto tampoco logra la entrada de estas células al estado quiescente. En células no transformadas, como se ha mencionado, la expresión de c-myc está fuertemente regulada para prevenir la sobreproducción de c-Myc. Lo anterior indica que en las células tumorales existe una falla en la regulación de c-myc que da como consecuencia altos niveles tanto del mRNA como de la proteína de c-myc. En algunos casos tal falla es debido a una amplificación o a un rearrreglo del gen de c-myc, pero la causa de la expresión no controlada en la mayoría de las células tumorales es desconocida.

3.4.4. MECANISMOS DE ACTIVACION.

Se ha encontrado que el proto-oncogen c-myc puede ser activado por diferentes mecanismos que resultan en el crecimiento no controlado de células tumorales. Los mecanismos de activación incluyen: inserción de virus, translocación cromosómica y amplificación del gen (Ratner et al., 1985; Kelly, 1986; Cole, 1986; Eisenman, 1989; Evan, 1990).

Inserción de virus. Los retrovirus se integran al genoma de la célula huésped como parte obligatoria de su ciclo de vida. Ya que los retrovirus tienen promotores fuertes o elementos de regulación a la alza (enhancer elements) pueden, en ciertas circunstancias, causar la expresión inapropiada de genes celulares vecinos. En el caso de que se inserte cerca de un proto-oncogene celular, como es el caso de c-myc, lo anterior puede tener graves consecuencias carcinogénicas.

Translocación cromosómica. Esta alteración se ha observado en plasmacitoma de ratón y en linfomas de Burkitt humano. El plasmacitoma de ratón presenta una translocación cromosómica característica que involucra la parte distal del cromosoma 15 y la parte distal de los cromosomas 12 ó 6. El brazo distal del cromosoma 15 contiene el gen de c-myc mientras que el brazo distal del cromosoma 12 y 6 contienen el gen que codifica para la inmunoglobulina de cadena pesada y de cadena ligera κ respectivamente. Esta translocación coloca al gen de c-myc en una región del genoma del ratón la cual tiene una alta actividad transcripcional en este tipo de células, lo cual da lugar a una expresión anormal de c-myc. En el linfoma de Burkitt humano se observa una translocación cromosómica similar que

involucra al cromosoma 8 (8q24) que contiene el locus de c-myc y a los cromosomas 14 (14q32), 2 (2p12) y 22 (22q11) los cuales contienen el locus de la cadena pesada, de la cadena ligera κ y de la cadena ligera λ de la inmunoglobulina respectivamente.

Amplificación del gen. La amplificación del gen de c-myc se ha reportado en diversos neoplasmas, incluyendo el carcinoma de colon, carcinoma de células pequeñas de pulmón, retinoblastoma, neuroblastoma, leucemia promielocítica y carcinoma de mama.

Como se puede observar, todos estos mecanismos involucran el rearrreglo del DNA que da como resultado altos niveles de expresión del gen de c-myc. Esto indica que c-myc promueve el crecimiento de células tumorales vía un cambio cuantitativo más que cualitativo de los niveles de la proteína.

3.5. C-FOS.

3.5.1. GENERALIDADES.

El proto-oncogen de c-fos originalmente fue descrito como el homólogo celular del oncogen acarriado por dos retrovirus murinos, FBR y FBJ, que estaban involucrados en la generación de osteosarcomas inducidos por radiaciones (Curran, 1988). El gen de c-fos se expresa en bajos niveles en la mayoría de los diferentes tipos de células. Sin embargo, su expresión es inducida temporalmente hasta altos niveles por una gran variedad de estímulos extracelulares.

c-fos es miembro de un conjunto de genes conocidos como genes de expresión temprana. Este conjunto se define por el hecho de que su expresión es inducida rápidamente por una gran variedad de estímulos extracelulares, aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto que los genes de expresión temprana llevan a cabo su acción al acoplar el estímulo de corto plazo a cambios a largo plazo en el fenotipo celular, como pueden ser el crecimiento y la diferenciación celular. Esta hipótesis fue reforzada por el descubrimiento de la función de regulación de la transcripción por la proteína de c-fos.

3.5.2. ESTRUCTURA.

La proteína de c-fos (c-Fos) es una fosfoproteína nuclear que está constituida por 380 aminoácidos. Esta proteína sufre extensas modificaciones post-traduccionales debido a la fosfo-esterificación de los residuos de serina en el extremo carboxi terminal de la proteína. Esta contiene un dominio en el que se repiten periódicamente cada siete aminoácidos un residuo de leucina. A este dominio se le denomina "zipper" de leucina. Adyacente al "zipper" de leucina se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos. Cuando la región del "zipper" de leucina es arreglada en una α -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Los residuos de leucina de una α -hélice interaccionan con los residuos de leucina presentes en otra α -hélice de una proteína diferente, con lo cual se facilita la dimerización a través de interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, el dominio de "zipper" de leucina facilita la formación de heterodímeros. Esta secuencia está presente en diversos factores de transcripción, tales como las oncoproteínas Fos, Myc y Jun, los factores de transcripción de la levadura GCN4 y yAP-1 y la proteína que une al elemento de respuesta a cAMP (CREB) (Hope and Struhl, 1987; Kouzarides and Ziff, 1988; Dang et al., 1989; Landschultz et al., 1988; Gonzalez et al., 1989).

Esta región conservada está compuesta por dos estructuras: una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) y el "zipper" de leucina.

Se ha demostrado (Sassone-Corsi et al., 1988b) que el dominio del "zipper" de leucina es necesario para que Fos forme un heterodímero con el producto de otro oncogen nuclear, c-jun. Sin embargo, la presencia de un "zipper" de leucina no es factor suficiente para la formación de dímeros. Fos no forma homodímeros y ni Fos ni Jun pueden formar dímeros con CREB (Dwarki et al., 1990) o GCN4 (O'Shea et al., 1989).

Deleciones en el extremo carboxi o amino terminal, así como inserciones o deleciones en el "zipper" de leucina de Fos y Jun anulan la dimerización. Sin embargo, la mutación de una sola leucina tanto en Fos como en Jun no afecta la formación del heterodímero, como tampoco la mutación de dos residuos de leucina consecutivos en Jun, no así la mutación de dos residuos consecutivos de leucina en Fos (Ransone and Verma, 1990).

La región rica en aminoácidos básicos medía la unión del heterodímero a una región específica del DNA, ya que inserciones o deleciones en esta región disminuyen o anulan la

unión al DNA pero no la formación del dímero. El heterodímero se une a regiones promotoras que contienen el elemento de respuesta a TPA (12-o-tetradecanoil- forbol-13 acetato) llamado TRE (TPA response element) o sitio de unión a AP-1.

A pesar de que el "zipper" de leucina es el dominio de dimerización principal y que la región básica es el dominio principal de unión al DNA, se debe de mantener en mente que la proteína completa interactúa y que aminoácidos fuera de estos dominios también contribuyen a la dimerización y unión del DNA (Curran et al., 1990).

3.5.3. FUNCION DE C-FOS.

De los primeros estudios que se hicieron sobre c-fos (Curran et al., 1985) se determinó que c-fos podría formar parte de un complejo proteico nuclear que se puede unir al DNA en presencia de extractos nucleares. En seguida se buscó la secuencia de nucleótidos que son reconocidos por el complejo de Fos. Por medio de diferentes metodologías, entre las cuales están la mutagénesis, estudios de competencia y ensayos de afinidad al DNA, eventualmente se identificó el sitio de unión como la secuencia consenso del factor de transcripción AP-1. Estos estudios establecieron una conexión entre Fos, Jun y AP-1, pero aún no estaba claro si Fos se unía directamente al sitio AP-1, o indirectamente por medio de la asociación con la proteína p39 u otra proteína. Una combinación de comparaciones estructurales e inmunológicas eventualmente identificaron a p39 como el producto proteico del proto-oncogen c-jun (Sassone-Corsi et al., 1988b). Más aún, se demostró que la cooperación entre estas dos oncoproteínas nucleares se requiere para la completa activación de la transcripción de los genes que tienen en su región promotora el elemento de respuesta a TPA (TRE) en células de mamífero transfectadas.

Fos directamente modula la función de Jun por medio de la formación del heterodímero Fos-Jun (Sassone-Corsi et al., 1988b). La proteína de Jun por sí sola puede formar un homodímero que se une a TRE, pero es un transactivador de la transcripción ineficiente. Fos, por el otro lado, no forma homodímeros, no se une como monómero al DNA ni activa la transcripción; sin embargo, en un heterodímero Fos-Jun, Fos no solamente contribuye a la unión específica del DNA, sino que también coopera en la transactivación.

3.5.4. REGULACION DE LA EXPRESION DE C-FOS.

El proto-oncogén de c-fos es expresado en bajos o indetectables niveles en la mayoría de las células en crecimiento exponencial. Sin embargo, su expresión es inducida por una gran variedad de agentes, tales como mitógenos, factores de diferenciación, agentes farmacológicos específicos, estrés y choque calórico. La inducción es rápida y pasajera y ocurre al nivel de la transcripción. La expresión del gen de c-fos aparece pocos minutos después de adicionar el inductor, alcanza su nivel máximo entre 30-120 minutos y es esencialmente indetectable después de 3-8 horas dependiendo del tipo de célula que sea tratada. Es probable que esta inducción rápida involucre modificaciones post-traduccionales de la proteína c-Fos. La inducción de la expresión de c-fos se lleva a cabo aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Lo anterior sugiere que la activación de la transcripción de c-fos después del tratamiento mitogénico se lleva a cabo por factores pre-existentes (Ransome and Verma, 1990).

La inducción del gen de c-fos se lleva a cabo por agentes que activan la vía intracelular de la proteína quinasa C/ dependiente de calcio, o la vía de la adenilato ciclasa. La inspección de la región promotora del gen de c-fos, Figura 3, revela la presencia de dos elementos de respuesta dependientes de cAMP (CREs) en las posiciones -60 y -350 los cuales son requeridas para la inducción por agonistas de la vía del adenilato ciclasa. Localizado entre las posiciones -299 y -320 está el elemento de simetría doble (DSE), llamado también elemento de respuesta a suero (SRE). Esta región es esencial para la inducción por suero, por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), por ésteres de forbol, por los oncogenes src y ras, por factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y por factores de crecimiento nervioso (NGF) (Ransome and Verma, 1990). La proteína de 67 KDa que se une a DSE es llamada factor de respuesta al suero (SRF). Esta proteína actúa como dímero y requiere de fosforilaciones para la activación transcripcional de genes que contienen en su región promotora DSE. Otra proteína de 62 KDa también ha sido implicada en la unión a DSE ya que forma un complejo terciario con SRF. Inmediatamente hacia el extremo 3' de DSE hay un elemento de respuesta a TPA (TRE) capaz de unir los complejos Fos/Jun. Así mismo, localizado entre las posiciones -1060 a -1300 se encuentra un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Weisz and Rosales, 1990).

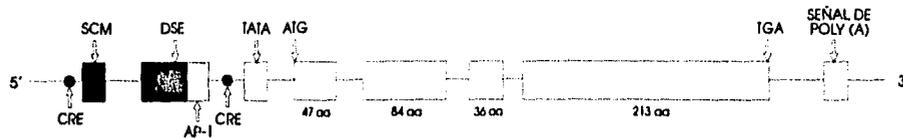


Figura 3. Estructura del gen c-fos (ratón) (Ransone and Verma, 1990).

3.6. C-KI-RAS.

3.6.1. GENERALIDADES.

Los oncogenes de la familia de ras han asumido una gran importancia en la patología molecular del cáncer y son probablemente la familia de oncogenes más estudiada. En tumores humanos se han detectado anomalías más frecuentemente en esta familia que en cualquier otra. Las anomalías son generalmente mutaciones puntuales, pero también se ha encontrado amplificación del gen y de la expresión.

Con base en su alto nivel de conservación en la evolución eucariótica se cree que estos genes juegan un papel fundamental en las funciones celulares básicas.

Independientemente de su origen filogénico, codifican para una proteína que se une a nucleótidos de guanina, tienen actividad de GTPasa y están asociados a la membrana celular. Estas propiedades, al igual que su significativa homología en secuencia con las proteínas G, sugieren que las proteínas ras pueden participar en la transmisión de señales a través de la membrana celular.

3.6.2. ESTRUCTURA.

Los tres genes de ras encontrados en mamíferos (c-Ki-ras, c-Ha-ras y N-ras) son miembros de una familia multigénica que está altamente conservada en eucariotes, incluyendo a la levadura.

Los genes de ras codifican para una proteína de 21 kDa (Ras). La secuencia de la proteína contiene cuatro dominios, los primeros 80 aminoácidos son idénticos en Ha-, Ki- y N-ras, mientras que el segundo dominio de 80 aminoácidos muestra menor grado de conservación (70-80%). La tercera región, que consta de 25 aminoácidos, es la región

variable, en la cual hay una gran divergencia entre las secuencias de las proteínas ras. La región carboxi terminal de cuatro aminoácidos es un motivo muy conservado, CAAX donde C es cisteína, A un aminoácido alifático (más frecuentemente leucina, isoleucina o valina, todos los cuales son residuos hidrofóbicos) y X es cualquier aminoácido.

Ras es sintetizada en el citoplasma, después de lo cual es modificada y translocada a la superficie interna de la membrana plasmática donde se une.

Los aminoácidos de Ras involucrados en la región efectora son los aminoácidos 31-40 y los involucrados en la unión del nucleótido son los aminoácidos 10-16, 57-62, 116-119 y 143-147.

3.6.3. REGION DE UNION A GTP.

La Figura 4 es una representación esquemática de Ras (McCormick, 1989). Los aminoácidos de Ras que hacen contacto con la purina del GTP son Asp-119 y Ala-146. Asp-119 forma parte de la secuencia Asn-Lys-X-Asp que se encuentra en la mayoría de las proteínas que se unen a GTP y es responsable de la especificidad de estas proteínas por nucleótidos de guanina. Asn-116 y el hidrógeno de lisina se unen a los grupos carbonilos de la cadena principal de los aminoácidos 13 y 14 respectivamente. Mutaciones en la región 116-119 reduce la afinidad de Ras por los nucleótidos de guanina y en algunos casos altera su especificidad. Phe-28 también contribuye a la unión del nucleótido proveyendo de una bolsa hidrofóbica para el anillo purínico. Así mismo, el grupo carbonilo de la cadena principal de este aminoácido se une por puentes de hidrógeno a la ribosa del GTP.

Los grupos fosfato del GTP interactúan con Ras a través de puentes de hidrógeno. El fosfato γ se une a lys-16, Gli-60 y Thr-35, mientras que el α forma un puente de hidrógeno con el grupo amido de la cadena principal del aminoácido 18. Otros contactos se efectúan a través del Mg^{2+} , el cual está coordinado a un oxígeno del fosfato β , a uno del γ y a los grupos hidroxilo de la cadena lateral de Ser-17 y Thr-35, los cuales se encuentran altamente conservados en proteínas que unen GDP-GTP. La región de Ras alrededor de la posición 12 forma una caja rígida alrededor de los fosfatos debido a todas las interacciones existentes.

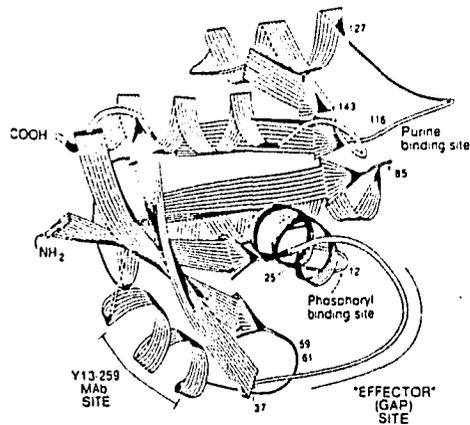


Figura 4. Estructura terciaria de la proteína de Ha-ras (McCormick, 1989).

3.6.4. REGION VARIABLE.

Esta región varía mucho entre todas las proteínas Ras. En la forma oncogénica de Ras la región variable no es necesaria para lograr la actividad transformadora. Lo anterior ha llevado a la especulación (McCormick, 1989) de que la región variable de cada tipo de proteína Ras normalmente recibe señales de diferentes vías anteriores y todas transmiten su señal por la misma vía posterior. Las mutantes oncogénicas están siempre activadas y por lo tanto no requieren de la región variable para recibir esta señal. A nivel mecanístico, se especula (McCormick, 1989) que señales recibidas interactúan con las regiones variables específicas para promover el intercambio de GDP a GTP en Ras normal. Este intercambio no sería necesario para mutantes oncogénicas que siempre tienen unido GTP.

Otras interpretaciones también son posibles: por ejemplo, las regiones variables pueden dirigir a diferentes proteínas Ras a sitios específicos de las células, tales como diferentes tipos de membranas. De acuerdo con este modelo los mecanismos de entrada y salida de la señal sería idéntico para todos los tipos de proteínas Ras de mamíferos.

3.6.5. REGION DE UNION AL EFECTOR

Esta región corresponde a los aminoácidos 32-40 y es idéntica en todas las proteínas Ha-, Ki-, y N-ras, lo cual sugiere que todas mandan la señal por la misma vía. En la estructura tridimensional de la proteína, la región efectora se encuentra en la superficie

externa, lo cual apoya la teoría de que esta región interactúa con otros componentes celulares.

3.6.6. FUNCION.

Todas las proteínas Ras son capaces de unir, intercambiar e hidrolizar nucleótidos de guanina, a pesar de que la actividad GTPasa de Ras mutado se encuentra disminuida.

Las mutaciones que se presentan *in vivo* que activan la función transformante de Ras ocurren en las posiciones 12 y 13, las cuales están en contacto directo con los grupos fosfato del nucleótido de guanina, o en la posición 61, el cual se encuentra adyacente a las posiciones 12 y 13. Se ha demostrado (Lemoine, 1990) que la sustitución de aminoácidos en las posiciones 12 y 61 interfieren con la coordinación de una molécula de agua la cual es indispensable para el ataque nucleofílico de GTP y por lo tanto reduce la actividad catalítica de la GTPasa.

Hasta hace poco no se sabía por qué la actividad transformante de ciertas proteínas Ras mutadas no se correlacionaba con la reducción relativa de la actividad GTPasa intrínseca. Por ejemplo, la proteína mutante de N-ras Asp-12 solo difiere su actividad GTPasa en 2 unidades con respecto a Ras normal. Sin embargo, es una proteína activa totalmente transformante. Este misterio se resolvió al descubrir una segunda proteína, la proteína activadora de GTPasa o GAP ("GTPase activating protein"), la cual influye la actividad catalítica de Ras. De tejido humano se han aislado dos formas de GAP, las dos derivadas de una sola molécula de mRNA por rompimiento alternativo, pero sólo una forma es expresada en el tejido adulto. GAP es una proteína citoplasmática de 120 kDa que estimula la actividad GTPasa de Ras normal en más de 100 unidades, pero la cual es incapaz de aumentar en lo absoluto la actividad catalítica de Ras mutado.

GAP actúa con Ras a través de su región efectora. GAP también se une a esta región en Ras mutado, pero es incapaz de aumentar su actividad catalítica, por lo cual no desactiva la señal asociada con el complejo Ras-GTP, lo cual sólo ocurre en Ras normal.

El hecho de que GAP esté unida a la región efectora de Ras sugiere que este es el blanco posterior para la transmisión de la señal de Ras. Ya que la región efectora está conservada en todas las proteínas Ras y que sólo una especie de GAP es responsable por la interacción, entonces todas las señales son canalizadas por una sola vía posterior. Sin

embargo, se ha propuesto (Lemoine, 1990) que la región carboxi terminal de Ras, la cual es distinta para cada miembro de la familia, puede estar implicada en la transmisión de señales, lo cual permitiría un sistema más flexible en el cual cada tipo de Ras podría usar vías separadas.

Actualmente no se conoce con precisión las interacciones tanto anteriores como posteriores de Ras y GAP, ya que la evidencia experimental es a veces confusa y hasta contradictoria. Mucha de esta evidencia se ha obtenido de estudios en los cuales se microinyecta el anticuerpo neutralizante de Ras (Y13-259) a células normales y tumorales. El tratamiento con este anticuerpo es capaz de revertir los rasgos característicos de la transformación provocados por el oncogen ras, al igual que aquellas causadas por los oncogenes *fms*, *src* y *fes* (McCormick, 1989). Todos estos oncogenes son tirosin quinasa asociadas a membrana. Además, la microinyección con este anticuerpo bloquea la síntesis de DNA y el incremento temprano de la expresión de *c-fos* estimulado por suero, por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) ó por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Estos experimentos han sido interpretados como evidencia de que Ras actúa posteriormente a los receptores de factores de crecimiento asociados a membrana y de los productos de los oncogenes con actividad tirosin quinasa en la cascada de transmisión de señales.

Los efectos biológicos de las serina/treonina quinasa producto de los oncogenes *mos* y *raf* no son bloqueados por microinyecciones de Y13-259, y la transformación provocada por *ras* u otro oncogen asociado a la membrana resulta en la fosforilación del producto del oncogen *raf* y estimulación de su actividad quinasa. Por lo tanto, los productos de estos oncogenes citoplasmáticos probablemente actúan posteriormente a Ras en la cascada de transmisión de señales.

Todos estos resultados han permitido formular un modelo (Lemoine, 1990) en el cual GAP, más que Ras, es el participante activo en estas vías. Se ha reportado (Lemoine, 1990) que GAP se une a las proteínas de *c-abl*, *v-abl*, *abl-bcr*, *v-src* y *v-fms* formando complejos estables y puede ser fosforilada por estas quinasa. GAP también se une fuertemente a los receptores de PDGF y de EGF (McCormick, 1989), los cuales catalizan la fosforilación de GAP. Se sabe que la forma fosforilada de GAP tiene una menor función de estimulante de la

actividad GTPasa en Ras-GTP, lo cual aumenta la señal generada por este complejo. Un esquema general de este modelo se observa en la Figura 5.

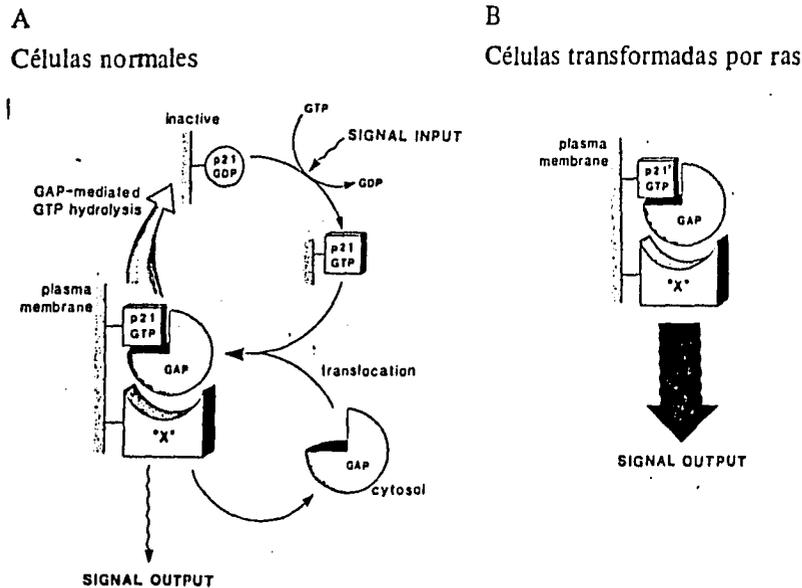


Figura 5. (A) Control de la actividad de p21 en células normales. La conversión de p21.GTP a p21.GDP es mediado por GAP. El complejo activo puede ser el de p21.GTP unido a GAP, el cual manda una señal al siguiente componente de la vía, señalado aquí como X. Se propone que este es un componente de membrana, ya que p21 debe de estar unido a la membrana para funcionar. (B) Actividad de p21 ras mutado. Las proteínas mutantes oncogénicas forman complejos con GAP, pero la conversión a p21.GDP no es estimulada, por lo cual p21.GTP permanece en el estado activo constitutivamente (McCormick, 1989).

Evidencia reciente (Lemoine, 1990) obtenida a través de estudios efectuados por experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GAP sugieren que GAP puede formar complejos con los productos proteicos del oncogen raf y la fosfolipasa C₂, lo cual involucra a estas moléculas en la vía de transmisión de señales vía GAP.

Es en el área de segundos mensajeros donde se han obtenido los resultados más confusos y contradictorios. En varios sistemas experimentales Ras puede incrementar o

reducir la actividad de la proteína quinasa C, la cual tiene efectos secundarios al nivel de fosfato de inositol en el citoplasma.

El último eslabón de la cadena de transmisión de señales a través de Ras es la acción de factores de transcripción tales como AP-1 (el cual es un complejo formado por los productos de los oncogenes c-fos y c-jun), el cual influencia la expresión de gran cantidad de genes celulares.

3.6.7. RAS EN EL CONTEXTO DEL CÁNCER.

La incidencia de mutaciones en ras en cáncer humano se resume en la Tabla 2. A partir de esta se obtienen las siguientes generalizaciones.

- 1.- La incidencia de mutaciones en ras varía enormemente entre diferentes tipos de cáncer.
- 2.- En un tipo particular de cáncer muy frecuentemente predomina un tipo de oncogen ras. Una interpretación sería que la ocurrencia de genes activados de ras refleja la expresión específica de los diferentes proto-oncogenes en los tejidos que fueron precursores del tumor. Sin embargo, este no parece ser el caso. Por ejemplo, se ha reportado (McCormick, 1989) que células con leucemia mieloide que tienen el oncogén activo de N-ras también expresan Ki-Ras y Ha-Ras. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de expresión específica en la célula precursora sana que dió lugar a la leucemia.
- 3.- En general, la presencia de un gen de ras activado no se correlaciona con el estado de desarrollo de un tumor en particular. En cáncer colorrectal, en el cual se cree que los adenomas evolucionan para dar lugar a los carcinomas malignos, la incidencia de mutaciones en ras es la misma en ambos estados. Lo anterior indica que en estos tumores la activación de ras ocurre relativamente temprano en el proceso multietapas de la progresión tumoral. Por lo tanto, la detección de ras mutado no tiene una clara implicación diagnóstica que pudiese ser útil para el tratamiento médico.

Tabla 2. Incidencia de mutaciones en el gen de ras en cáncer humano (McCormick, 1989).

Tipo de tumor	Incidencia (%)	Gen ras activado predominantemente
Pulmon (adenocarcinoma)	30	Ki-ras
Colon (adenocarcinoma)	50	Ki-ras
Carcinoma pancreático	90	Ki-ras
Seminoma	40	Ki-ras, N-ras
Melanoma	20	N-ras
Carcinoma de vejiga	6	N-ras
Tiroides	50	Todos los tipos
Mieloide	30	N-ras

3.7. P53

3.7.1. ESTRUCTURA PRIMARIA DE p53.

La proteína de p53 está compuesta por 393 aminoácidos y en condiciones normales se encuentra localizada en el núcleo. El extremo amino terminal es muy ácido con una carga neta que es similar a la que presentan los transactivadores de la transcripción, tales como la proteína Gal-4. El extremo carboxi terminal es rico en aminoácidos básicos similar a aquellos dominios que se unen al DNA. Así mismo, la proteína tiene tres señales de localización nuclear (NLS).

Hay cinco regiones en la secuencia primaria de p53 que son altamente conservadas a lo largo de la evolución. Se cree que estas regiones sirven para retener una estructura y/o función necesaria. Las mutaciones puntuales que se han detectado en cáncer humano se localizan predominantemente en estas regiones conservadas. Los sitios en los cuales las mutaciones son detectadas con alta frecuencia son llamados "hot spots" y estos incluyen los codones 175, 248, 274 y 281.

Así mismo, se han detectado mutaciones en la línea germinal en familias predisuestas a padecer cáncer de varios tipos. Esta forma hereditaria de cáncer se le llama

síndrome de Li-Fraumeni. Las células germinales de estos individuos son heterocigotos para p53 tipo silvestre (p53wt) y mutado mientras que los tumores de estos pacientes son homocigotos para p53 tipo mutado.

La proteína p53wt tiene una vida media corta (usualmente menos de 30 minutos), inhibe el crecimiento de células tumorales en cultivo e inhibe la transformación de fibroblastos por oncogenes cooperativos. La proteína p53wt presenta actividad de unión al DNA tanto específica como inespecífica. Esta actividad es requerida para su función de transactivador de la transcripción.

La proteína p53wt forma complejos con varias proteínas oncogénicas provenientes de virus. Por ejemplo, se unen con el antígeno largo T de SV40, con E6 de HPV (papillomavirus humano) y con la proteína E1B de adenovirus (Scheffner et al., 1990; Ludlow, 1993; Vousden, 1993; Moran, 1993).

En contraste, la proteína p53 tipo mutado tiene una vida media prolongada de varias horas, no suprime el crecimiento de células tumorales y no inhibe la transformación de fibroblastos por oncogenes cooperativos. Este tipo de proteínas no forma complejos con el antígeno largo T de SV40.

3.7.2. FUNCION MOLECULAR DE p53 TIPO SILVESTRE Y MUTADO.

La secuencia primaria de p53 predice un papel para la proteína p53wt de transactivador de la transcripción.

Los primeros estudios de la posible función de p53wt como regulador de la transcripción se llevaron a cabo fusionando p53 al dominio de Gal4 que se une al DNA. La cotransfección de células de levadura o de mamífero con un gen reportero que responde a Gal4 y al gen fusionado p53/Gal4 dió lugar a una gran inducción de la actividad del gen reportero comparada con la actividad inducida únicamente por Gal4 (Unger et al., 1990). Dos mutantes murinas p53-135V y p53-KH215 al ser fusionadas con el dominio que se une al DNA de Gal4 fueron inactivos en transactivar al gen reportero.

La región de p53 involucrada en la transactivación está localizada en el dominio ácido del extremo amino terminal y está ubicado en los primeros 42 aminoácidos.

Estos resultados indicaron que p53wt puede funcionar como transactivador de la transcripción cuando es fusionado a un dominio que se une al DNA y que p53 tipo mutado es, por lo general, incapaz de llevar a cabo la transactivación de la transcripción.

Recientemente se determinó un sitio consenso donde se une específicamente p53wt. Este consiste en dos copias de un elemento de diez pares de bases que tiene la siguiente secuencia:

5'- Pu Pu Pu C (A/T) (T/A) G Py Py Py - 3'

El espacio entre los monómeros es entre cero y trece pares de bases. Estudios *in vitro* demostraron que p53wt se une a esta secuencia, pero no así p53 tipo mutado como 143A, 175H y 248W.

Basándose en la naturaleza palindrómica del DNA al cual se une específicamente p53wt se ha especulado que éste se une al DNA ya sea como homodímero, homotetrámero o posiblemente como heterodímero formando un complejo con otra proteína nuclear.

La identificación de elementos que responden a p53wt refuerzan la idea de que esta secuencia es un sitio de unión específico para p53wt. Las secuencias de DNA a las cuales se une p53wt han sido funcionalmente identificadas al aislar y caracterizar los elementos de respuesta a p53wt en genes que son regulados por p53wt, como es el caso del promotor de la creatinina fosfoquinasa específica de músculo murino (MCK). En este promotor hay tres copias imperfectas del sitio consenso donde se une el monómero de p53wt al DNA. El gen de MCK es un marcador de diferenciación específico de músculo. El elemento de respuesta a p53wt está localizado entre -2800 y -3300 pares de bases hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. A esta región solamente se une p53wt pero no la tipo mutado. La localización del sitio de unión de p53wt en el promotor de MCK sugiere que p53wt puede funcionar como un transactivador de la transcripción sin necesidad de Gal4.

Se ha identificado otro elemento de respuesta a p53wt en el tercer exón de GADD45, el cual es inducido después de que las células que expresan p53wt son expuestas a radiaciones gama. En células que tienen p53 tipo mutado o que carecen de la proteína p53wt al someterlas a radiaciones gama se induce muy pobremente la expresión de este gen o no se induce en lo absoluto. El elemento de respuesta en GADD45 coincide en diecinueve de las veinte bases que conforman la secuencia consenso.

En estudios de transfección temporal se observó la existencia de algunos genes, como c-fos y c-jun, cuya expresión es regulada por p53wt aún cuando dentro de su región promotora no existe un sitio de unión para esta proteína (Ginsberg et al., 1991). La expresión de estos genes es suprimida por p53wt. En la Tabla 3 se mencionan algunos de los promotores que son regulados por p53wt.

Tabla 3. Efecto de p53wt en la actividad de promotores en estudios de transfección pasajera (Zambetti and Levine, 1993).

Promotores que son suprimidos por p53wt:

- c-Fos de humano
- c-Jun de humano
- IL-6 de humano
- β -Actina de humano
- MDR-1 de humano

Promotores que no son suprimidos por p53wt:

- EGF de humano
- Ha-Ras de humano
- β -Actina de pollo
- β -Actina de rata
- hsc 70 de rata
- p53 de rata

La gran diversidad de promotores que son inhibidos por p53wt sugiere que esta proteína opera por un mecanismo general en la regulación de la transcripción de estos genes. De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que (Seto et al., 1992) p53wt puede suprimir la expresión de genes por medio de la inhibición de la transcripción al interactuar con la proteína que se une a la caja TATA (TBP). En un ensayo de transcripción *in vitro* se usó la proteína purificada de p53wt, extractos nucleares y un gen quimérico compuesto por el promotor mínimo y el gen reportero CAT. La adición de p53wt, pero no la de p53m, al ensayo de transcripción dió lugar a la disminución de la transcripción de la quimera. La caracterización bioquímica de este efecto demostró una interacción entre la proteína p53wt y TBP. La proteína p53m no se unió a TBP.

Con base en lo anterior, se concluye que p53wt puede influenciar la expresión génica por medio de la transactivación positiva de genes que contienen en su DNA un elemento de unión a p53wt y en una manera negativa por medio de la supresión de la transcripción de algunos genes que no contienen dicho sitio de respuesta a p53wt. Estas observaciones predicen un modelo para la función de p53wt en la supresión de tumores que incluye la inhibición de la transcripción de genes que promueven el crecimiento, tales como c-fos y c-jun, y la inducción de genes que están involucrados en el control negativo del crecimiento y de la diferenciación

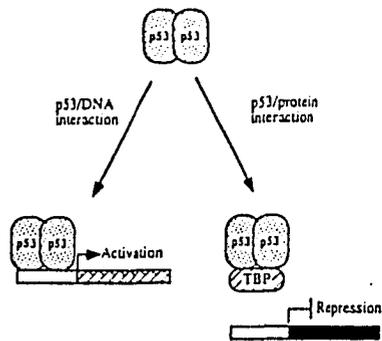
3.7.3. REGULACION DE LA FUNCION DE p53.

Existen múltiples mecanismos para la regulación de la función de p53wt, entre los cuales se encuentran:

- 1.- La función de p53 es inactivada al sufrir una mutación. Este tipo de inactivación es frecuentemente observada en varios tipos de carcinomas. Así mismo, p53m puede actuar como oncogen ya que se une a p53wt formando oligómeros, los cuales no presentan la función normal de p53wt.
- 2.- La inactivación de la función de p53wt también puede ocurrir a través de la formación de complejos con productos de oncogenes virales tales como el antígeno T largo de SV40, la proteína E1B de adenovirus tipo 5 y el producto del gen E6 de papilomavirus humano tipo 16 y 18 (Ludlow, 1993; Moran, 1993; Vousden, 1993). Al unirse estas proteínas virales a p53wt impiden que este lleve a cabo su función tanto de activador de la transcripción como de inhibidor de la misma (Figura 6). En este aspecto, estas proteínas virales presentan similitudes a ciertas proteínas mutadas de p53.
- 3.- La función de p53wt puede ser regulada negativamente por el producto del gen MDM-2. El producto del gen MDM-2 interactúa con la proteína de p53. Basado en estas observaciones se ha postulado que MDM-2 puede ser un oncogen ya que inhibe la función de p53wt. La proteína de MDM-2 contiene una señal de localización nuclear, un dominio de aminoácidos ácidos y dos dedos de zinc, lo cual sugiere que MDM-2 puede funcionar como activador de la transcripción. Se ha especulado que MDM-2 puede regular la expresión de genes que promueven el crecimiento y que p53wt puede inhibir la expresión de estos genes bloqueando la actividad de unión al DNA de MDM-2 u otra función transactivadora de MDM-2. Recientemente se descubrió que p53wt también puede inducir

la expresión del gen de MDM-2. Basados en estos resultados se ha propuesto un modelo de autorregulación para la expresión de p53wt (Zambetti and Levine, 1993). En células normales puede existir un balance muy fino entre bajos niveles de p53wt y la proteína de MDM-2. Un cambio en este balance a un exceso de la proteína de MDM-2 puede promover el crecimiento celular mientras que un exceso de la proteína de p53wt puede inhibir la proliferación celular. Un incremento en los niveles de la proteína de p53wt resulta en el incremento de la expresión de los genes que responden a p53wt, incluyendo el gen de MDM-2. La elevación de los niveles de MDM-2 podría, a su vez, inhibir la transactivación por p53wt. Este círculo podría mantener el equilibrio entre la proteína supresora de tumores p53 y el producto proto-oncogénico de MDM-2.

UNINFECTED CELL



HPV INFECTED CELL

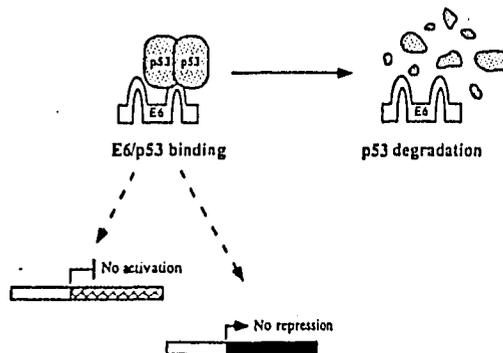


Figura 6. Consecuencia de la expresión de E6 en el control de la transcripción mediada por p53. p53wt puede activar y reprimir la expresión de genes celulares, ya sea a través de secuencias de DNA específicas o vía la interacción con otros factores de transcripción como TBP. La unión a E6 impide que p53 lleve a cabo ambas actividades, previniendo de esta forma la regulación del crecimiento mediado por p53 (Vousden, 1993).

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

4.1. REACTIVOS.

REACTIVOS ALDRICH CHEMICAL COMPANY, INC.

-Tiocianato de guanidina.

REACTIVOS CALBIOCHEM.

-Ribonucleasa A.

REACTIVOS DUPONT.

-Membrana de nylon: Gene Screen Plus.

REACTIVOS GIBCO BRL.

-Cloruro de cesio.

-Sistema de marcado de ADNc por iniciadores aleatorios (random primers).

-Amortiguador 10x para BamH I (REACT 3 Buffer).

-Enzima de restricción BamH I.

REACTIVOS J.T. BAKER.

- Alcohol isoamílico.
- Citrato de sodio.
- Cloroformo.
- Cloruro de sodio.
- Formaldehido 37%.

REACTIVOS MALLINCKRODT, INC.

- 8-hidroxiquinoleína.

REACTIVOS MERCK.

- Acetato de sodio.
- Acido acético glacial.
- Agar-agar.
- Azul de bromofenol.
- Etanol absoluto.
- Hidróxido de sodio.
- Peptona de caseína.

REACTIVOS NEW ENGLAND BIOLABS, INC.

- Amortiguador 10x para EcoR I (NEBuffer EcoR I).
- Amortiguador 10x para Hind III (NEBuffer 2).
- Enzima de restricción EcoR I.
- Enzima de restricción Hind III.

REACTIVOS PHARMACIA FINE CHEMICALS.

- Sephadex G-50.

REACTIVOS SIGMA CHEMICAL COMPANY.

- Acetato de potasio.
- Agarosa.
- Ampicilina anhidra.
- β-mercaptoetanol.
- Dietilpirocarbonato (DEPC).
- Dodecilsulfato de sodio (SDS).
- Extracto de levadura.

- Ficoll tipo 400.
- Fosfato sódico dibásico heptahidratado.
- Fosfato sódico monobásico monohidratado.
- Glucosa.
- Lauril sarcosilato de sodio.
- Lisozima.
- Sal disódica del ácido de etilendiamin tetracético (Na_2EDTA).
- Tris-HCl.
- Xilencianol.

4.2. SOLUCIONES.

4.2.1. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA MINIPREPARACION Y AMPLIFICACION DE LOS PLASMIDOS.

1.-Medio de cultivo líquido LB.

- 10 g NaCl.
- 5 g extracto de levadura.
- 10 g peptona.
- Agua c.b.p. 1000 ml.
- Ajustar el pH = 7.5 y esterilizar por autoclave.

2.-Medio de cultivo en placa LB.

- 10 g NaCl.
- 5 g extracto de levadura.
- 10 g peptona.
- 5 g agar.
- Agua c.b.p. 1000 ml
- Ajustar el pH = 7.5 y esterilizar por autoclave.

3.-Solución de ampicilina 12.5 mg/ml.

- 12.5 mg/ml ampicilina.
- Amortiguador de fosfatos 0.6 M pH = 6.4.
- Esterilizar por filtración en Millipore 0.45 μm . Se usa a una concentración de 35-50 $\mu\text{g/ml}$.

4.-Solución STE pH = 8.

0.1 M NaCl.

10 mM Tris-HCl (pH = 8).

1 mM EDTA (pH = 8).

Se esteriliza por autoclave.

5.-Solución A.

50 mM glucosa.

25 mM Tris-HCl (pH = 8).

10 mM EDTA (pH = 8)

Esterilizar por autoclave y guardar a 4° C. Justo antes de usarse se complementa con 6 mg/ml de lisozima.

6.-Solución de lisozima.

10 mg/ml lisozima.

10 mM Tris-HCl (pH = 8).

Se prepara justo antes de usarse.

7.-Solución B.

0.2 N NaOH (recién diluido de una solución 10 N de NaOH).

1% SDS.

8.-Solución C.

60 ml acetato de potasio 5 M.

11.5 ml ácido acético glacial.

28.5 ml agua.

La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

9.-Solución TE (pH = 8.0).

10 mM Tris-HCl (pH = 8).

1 mM EDTA (pH = 8).

10.-RNAsa pancreática.

10 mg/ml RNAsa pancreática libre de DNAsa.

10 mM Tris-HCl (pH = 7.5).

15 mM NaCl.

La solución se calienta 15 minutos a 100° C. Se permite que se enfríe a temperatura ambiente y se guarda en alícuotas a -20° C.

11.-Fenol saturado pH > 7.8

Licuar el fenol a 68° C y adicionar 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%. Adicionar un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M pH = 8 y agitar durante 15 minutos, después de los cuales se descarta la fase acuosa (superior). Se repite la operación dos veces más y se adiciona un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M pH=8. Se agita durante 15 minutos y se descarta la fase acuosa. Se repite la misma operación hasta que el pH del fenol sea superior a 7.8. El fenol se almacena con 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH = 8 conteniendo 0.2% de β-mercaptoetanol. Se almacena en un frasco obscuro a 4° C.

12.-Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1).

13.-Solución D.

1 volumen de fenol saturado pH > 7.8.

1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico.

Se prepara justo antes de usarse.

14.-Acetato de sodio 3 M (pH = 5.2).

3 M acetato de sodio.

Ajustar el pH con ácido acético glacial y esterilizar por autoclave.

15.-Amortiguador TBE 10x.

54 g Trizma base.

27.5 g ácido bórico.

20 ml EDTA 0.5 M (pH = 8).

Agua c. b. p. 500 ml.

Se esteriliza por autoclave.

16.-Bromuro de etidio 10 mg/ml.

17.-Gel de agarosa 1% en TBE.

1 g agarosa.

100 ml TBE 0.5x.

0.5 µg/ml bromuro de etidio.

18.-Solución amortiguadora Loading 6x tipo II.

0.25% azul de bromofenol.

0.25% xilencianol.

15% Ficoll tipo 400.

Se prepara en condiciones esteriles.

19.-Etanol absoluto.

20.-Etanol al 80%.

21.-Etanol al 70%.

22.-Agarosa.

4.2.2. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA DIGESTION ENZIMATICA DE LOS PLASMIDOS.

1.-Enzima de restricción Eco RI

Escherichia coli RY 13. 20,000 U/ml. Se usa 2 U/µg.

2.-Enzima de restricción BamH I.

Bacillus^l amyloliquefaciens H. 12,000 U/ml. Se usan 2 U/µg.

3.-Enzima de restricción Hind III.

Haemophilus influenza Rd. 20,000 U/ml. Se usan 2 U/µg.

4.-Amortiguador 1x para EcoR I (pH = 7.5 a 25° C).

50 mM NaCl.

100 mM Tris-HCl

5 mM MgCl₂.

0.025% Triton x-100.

5.-Amortiguador 1x para BamH I.

50 mM Tris-HCl (pH = 8)

10 mM MgCl₂.

0.1 M NaCl.

6.-Amortiguador 1x para Hind III (pH = 7.9 a 25° C).

50 mM NaCl.

10 mM Tris-HCl.

10 mM MgCl₂.

1 mM Ditioneitol.

7.-Triton X-100 1%.

8.-Solución Tris-HCl 1M (pH = 7).

Esterilizar por autoclave.

4.2.3. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA PURIFICACION DEL cDNA.

1.-Amortiguador TBE 10x. Ver arriba.

2.-Bromuro de etidio 10 mg/ml.

3.-Gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5x.

1.2 g agarosa.

100 ml TBE 0.5x.

0.5 µg/ml bromuro de etidio.

4.-Solución amortiguadora

Loading 6x tipo II. Ver arriba.

5.-Solución D. Ver arriba.

6.-Acetato de sodio 3 M (pH = 5.2). Ver arriba.

7.-Solución TE (pH = 8). Ver arriba.

8.-Etanol absoluto.

9.-Etanol 80%.

4.2.4. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA EXTRACCION DE RNA.

1.-Amortiguador de homogenización.

4 M tiocianato de guanidina.

0.1 M Tris -HCl (pH = 7.5)

0.1% (0.14 M) β -mercaptoetanol.

Se disuelven 50 g de tiocianato de guanidina en 10 ml de Tris-HCl 1 M pH = 7.5. Se adiciona agua c.b.p. 100 ml. Se esteriliza por filtración en Millipore de 0.45 μ m. Se guarda a temperatura ambiente y justo antes de usarse se adiciona el β -mercaptoetanol a una concentración final de 0.1%.

2.-Lauril sarcosinato de sodio 10%.

3.-Solución D. Ver arriba.

4.-Solucion CsCl 5.7 M/EDTA 0.01 M (pH = 7.5)

96 g CsCl.

90 ml EDTA 0.01 M (pH = 7.5)

0.1% DPC.

Esterilizar por autoclave. Permitir que se enfríe y ajustar el volumen a 100 ml con agua estéril tratada con DEPC.

5.-Solución TE (pH = 7.6).

10 mM Tris-HCl (pH = 7.6).

1 mM EDTA (pH = 8).

6.-Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% .

10 g SDS.

90 ml agua.

Disolver el SDS en el agua calentando a 68° C. Ajustar el pH a 7.2 y el volumen a 100 ml con agua.

7.-Solución TE/SDS (pH = 7.6).

TE (pH = 7.6)

0.1% SDS.

Se esteriliza por autoclave.

8.-Etanol absoluto.

9.-Etanol 80%.

10.-Etanol 70%.

4.2.5. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA ELECTROFORESIS DEL RNA.

1.-Solución HEPES-EDTA 10x.

0.5 M HEPES.

0.01 M EDTA.

Ajustar el pH a 7.8 y esterilizar por autoclave.

2.-Bromuro de etidio (10 mg/ml). Ver arriba.

3.-Amortiguador Loading 6x tipo II. Ver arriba.

4.-Amortiguador de corrida.

100 ml HEPES-EDTA 10x.

153 ml formaldehído 37%.

747 ml agua estéril tratada con DEPC.

5.-Formaldehído 37%.

6.-Formamida.

7.-Agarosa.

4.2.6. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA TRANSFERENCIA A FILTROS DE NYLON.

1.-Solución SSC 20x.

175.3 g NaCl.

88.2 g citrato de sodio.

800 ml agua.

Ajustar el pH a 7.0, ajustar el volumen a 1 litro. Esterilizar por autoclave.

4.2.7. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA HIBRIDACION NORTHERN BLOT.

1.-Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%. Ver arriba.

2.-Solución EDTA 0.5 M (pH = 8).

186.1 g Na₂EDTA * 2 H₂O.

800 ml agua.

Ajustar el pH a 8.0 y el volumen a 1 litro. Esterilizar por autoclave.

3.-Reactivo de Denhardt 50x.

5 g Ficoll tipo 400.

5 g polivinilpirrolidina.

5 g ASB.

Agua c.b.p. 500 ml.

Se esteriliza por filtración y se guarda a -20° C.

4.-Solución fosfato de sodio dibásico 0.6 M.

0.6 M Fosfato de sodio dibásico.

0.15 M NaCl.

5.-Solución fosfato de sodio monobásica 0.6 M.

0.6 M Fosfato de sodio monobásico.

0.15 M NaCl.

6.-Solución PBS 0.6 M (pH = 6.5).

A la solución de fosfato de sodio dibásico se le agrega la solución de fosfato de sodio monobásico hasta obtener el pH deseado. Se esteriliza por autoclave.

7.-DNA esperma de salmon 1 mg/ml.

8.-Formamida.

9.-Solución SSC 20x. Ver arriba.

10.-Mezcla de iniciadores aleatorios (Random Primers) (pH = 6.8).

0.67 M HEPES.

0.17 M Tris-HCl.

17 mM MgCl₂.

33 mM β-mercaptoetanol.

1.33 mg/ml ASB.

18 U.A. (260 nm) U/ml de iniciadores oligodeoxiribonucleótidos (fracción de hexámeros).

11.-Solución dATP, solución dGTP, solución dTTP.

0.5 M dATP, 0.5 M dGTP y 0.5 M dTTP disueltos en 3mM Tris-HCl (pH = 7) y 0.2 mM Na₂EDTA.

12.-[α-³²P] dCTP.

13.-Fragmento Klenow (fragmento largo de la DNA polimerasa I). 3 U/μl.

Fragmento Klenow

100 mM amortiguador de fosfato de potasio (pH = 7). 10

mM β-mercaptoetanol.

50% (v/v) glicerol.

14.-Sephadex G-50.

10 g de sephadex G-50 se lavan varias veces con 160 ml de agua para eliminar el dextran soluble. Se equilibra la resina con TE (pH = 8) y se esteriliza por autoclave.

15.-Amortiguador de inactivación del fragmento Klenow.

0.2 M Na₂EDTA (pH = 7.5).

16.-Solución TE (pH = 8). Ver arriba.

4.2.8. SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA REMOCION DE LAS SONDAS RADIOACTIVAS.

1.-Formamida.

2.-Solución SSPE 20x.

175.3 g NaCl.

27.6 g NaH₂PO₄ * H₂O.

7.4 g EDTA

800 ml agua.

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH y el volumen a 1 litro. Esterilizar por autoclave.

4.3 PROCEDIMIENTO.

4.3.1. MINIPREPARACION DE LOS PLASMIDOS.

1.-Se consiguieron bacterias E-coli las cuales contenian insertos plásmidos con el cDNA de c-myc, c-fos, c-Ki-ras y P53. Estas se encontraban sembradas en placas de LB con ampicilina como antibiótico.

2.-Transferir una sola colonia bacterial a 2 ml de medio líquido LB que contiene 35-50 µg/ml de ampicilina.

3.-Incubar el cultivo a 37°C con agitación vigorosa por 24 horas.

4.-Vaciar 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf.

- 5.-Centrifugar el tubo a 12,000 rpm por 30 segundos a 4°C. Guardar el resto del cultivo a 4°C.
- 6.-Remover el medio de cultivo con una pipeta pasteur estéril dejando ligeramente humedecida la pastilla de bacterias.
- 7.-Resuspender la pastilla bacterial en 0.5 ml de STE pH= 8 y recentrifugar en las mismas condiciones.
- 8.-Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla bacterial en 100 µl de solución A fría agitando en vortex.
- 9.-Adicionar 200 µl de solución B recientemente preparada. Homogenizar el contenido invirtiendo el tubo. No usar vortex.
- 10.-Colocar el tubo en hielo.
- 11.-Agregar 150 µl de solución C fría y agitarlo con el vortex suavemente en posición invertida. Guardar el tubo en hielo por 3 a 5 minutos.
- 12.-Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 13.-Precipitar el DNA de doble hebra con 2 volúmenes de etanol. Mezclar por inversión y permitir que repose por 30 minutos a -20° C.
- 14.-Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- 15.-Remover los sobrenadantes y enjuagar la pastilla de DNA de doble hebra con 1 ml de etanol al 70% a 4°C.
- 16.-Remover los sobrenadantes y permitir que la pastilla se seque durante 10 minutos.
- 17.-Redisolver el DNA en 50 µl de TE pH= 8 que contenga 25 µg/ml RNAsa pancreática libre de DNAsa.

18.-Se incuba a 37°C por 30 minutos.

19.-Se guarda a -20° C.

20.-Para la determinación de la integridad del plásmido purificado se colocan en tubos eppendorf independientes 1-3 µg de plásmido, 1 µl de amortiguador Loading 6x y se completa el volumen a 6 µl con agua estéril. Usar como marcador de masa molecular el fago λ digerido con Hind III. Mezclar 1 µg de λ con 1µl de amortiguador Loading 6x y completar el volumen a 6 µl con agua estéril.

21.-Colocar las muestras en los carriles de un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x. Migrar a 80 V con amortiguador electrolito TBE 0,5x por dos horas.

22.-Observar las bandas de los plásmidos con luz UV en el transiluminador y fotografiar el gel.

4.3.2. AMPLIFICACION DE LOS PLASMIDOS.

1.-Tomar una colonia de cada placa y sembrarla en medio líquido LB que contiene de 35 a 50 µg/ml de ampicilina.

2.-Incubar a 37° C con agitación por 24 horas.

3.-Transferir la solución a un tubo Beckman de 400 ml. Colocarlo en hielo 10 minutos.

4.-Centrifugar a 4,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 30 ml de solución STE. Centrifugar en las mismas condiciones.

5.-Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de solución A. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

6.-Adicionar 10 ml de solución B recién preparada. Mezclar cuidadosamente y colocar en hielo por 5 minutos.

7.-Agregar 7.5 ml de solución C fría. Centrifugar a 18,000 rpm por 25 minutos a 4° C.

- 8.-Transferir los sobrenadantes a tubos corex de 150 ml y extraerlos con un volumen de solución D. Centrifugar a 4,000 rpm durante 5 minutos a 4° C.
- 9.-Extraer los sobrenadantes con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico. Centrifugar a 6,000 rpm por 5 minutos a 4° C.
- 10.-Tomar los sobrenadantes y precipitarlos con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20° C durante 2 horas.
- 11.-Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4° C.
- 12.-Lavar la pastilla con 5 ml de etanol al 80% y centrifugar a 12,000 rpm por 30 minutos a 10° C.
- 13.-Resuspender la pastilla en 5 ml de TE pH= 8 y 500 µl de acetato de sodio 3 M pH= 5.2.
- 14.-Precipitar con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se deja reposar a -20° C por 12 horas.
- 15.-Centrifugar a 10,000 rpm por 30 minutos a 4° C.
- 16.-Desechar los sobrenadantes y resuspender la pastilla en 1 ml de TE pH= 8. Se transfiere a un tubo eppendorf y se adiciona a cada tubo 25 µg/ml de RNAsa pancreática libre de DNAsa.
- 17.-Incubar 12 horas a 4° C.
- 18.-Realizar diluciones 1:100 y leer en el espectrofotómetro la absorbencia que presentan dichas diluciones a 260, 280 y 310 nm.
- 19.-Determinar la pureza calculando la relación 260/280. Esta relación debe de ser cercana a 2.
- 20.-Determinar el rendimiento sabiendo que: 1 unidad de U.A. a 260 nm = 50 µg/ml de DNA.

21.-Para la determinación de la integridad del plásmido purificado se colocan en tubos eppendorf independientes 1-3 µg de plásmido, 1 µl de amortiguador Loading 6x y se completa el volumen a 6 µl con agua estéril. Usar como marcador de masa molecular el fago λ digerido con Hind III. Mezclar 1 µg de λ con 1µl de amortiguador Loading 6x y completar el volumen a 6 µl con agua estéril.

22.-Colocar las muestras en los carriles de un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x. Migrar a 80 V con amortiguador electrolito TBE 0.5x por dos horas.

23.-Observar las bandas de los plásmidos con luz UV en el transiluminador y fotografiar el gel.

4.3.3. DIGESTION ENZIMATICA DE LOS PLASMIDOS.

Plásmido con c-myc integrado.

1.-Colocar en un tubo eppendorf:

10 µg de plásmido purificado con c-myc integrado.

5 µl de amortiguador 10x (10 veces concentrado) para EcoR I.

1 µl de EcoR I (20 unidades).

Agua estéril cbp 50 µl.

2.-Se mezclan perfectamente bien y se incuba a 37° C durante 12 horas.

Plásmido con P53 integrado.

1.-Colocar en un tubo eppendorf:

10 µg de plásmido purificado con P53.

5 µl de amortiguador 10x para BamH I. de BamH I (20 unidades).

Agua estéril cbp 50 µl.

2.-Se mezclan perfectamente bien y se incuba a 37° C durante 12 horas.

Plásmido con c-Ki-ras integrado.

1.-Colocar en un tubo eppendorf:

10 µg de plásmido purificado con c-Ki-ras.

5 µl de amortiguador 10x para Hind III.

1 µl de Hind III (20 unidades).

Agua estéril cbp 50 µl.

2.-Se mezclan perfectamente bien y se incuba a 37° C durante 12 horas.

3.-Agregar:

- 5.5 μ l Tris-HCl 1M pH= 7.
- 1.5 μ l de Tritón X-100 al 1%.
- 1 μ l de Eco-RI.
- 2 μ l de agua estéril

4.-Se mezclan perfectamente bien y se incuba a 37° C durante 12 horas.

Plásmido con c-fos integrado.

1.-Colocar en un tubo eppendorf:

- 10 μ g de plásmido purificado con c-fos integrado.
- 5 μ l de amortiguador 10x para BamH I.
- 1.66 μ l de BamH I (20 unidades).
- Agua estéril cbp 50 μ l.

2.-Se mezclan perfectamente bien y se incuba a 37° C durante 12 horas.

4.3.4. PURIFICACION DEL cDNA.

1.-Preparar un gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5x.

2.-En un tubo eppendorf colocar 50 μ l del plásmido digerido y 10 μ l del amortiguador Loading 6x. Mezclar bien.

3.-En otro tubo mezclar 1 μ g de λ digerido con Hind III con 1 μ l de amortiguado Loading 6x y completar el volumen a 6 μ l con agua estéril.

4.-Colocar las muestras de DNA y del fago λ digerido en los pozos del gel de agarosa al 1.2% y migrarlo a 80 V en amortiguador electrolito TBE 0.5x por dos horas.

5.-Observar las bandas con luz UV en un transiluminador.

6.-Cortar con un bisturí el gel que contiene la banda del cDNA.

7.-Lavar con agua estéril una bolsita de diálisis.

8.-Colocar dentro de la bolsa de diálisis el pedazo de gel que contiene la banda de cDNA.

- 9.-Agregar 500 µl de TBE 0.5 x.
- 10.-Cerrar la bolsa de diálisis cuidando que no quede ninguna burbuja de aire dentro de la bolsa y colocarla dentro de una cámara para electroforesis.
- 11.-Migrar la banda a 80 V en amortiguador electrolito TBE 0.5x por 1 hora.
- 12.-Invertir el sentido de la corriente y migrar a 80 V por 45 segundos.
- 13.-Tomar la solución de TBE 0.5x que se encuentra dentro de la bolsa de diálisis con una pipeta Gilson y colocarlo dentro de un tubo eppendorf.
- 14.-Enjuagar con 200 µl de TBE 0.5x la bolsa de diálisis. Tomar el TBE y juntarlo con el recolectado anteriormente.
- 15.-Extraer el cDNA con 1 volumen de solución D.
- 16.-Recolectar la fase acuosa y agregar acetato de sodio 3 M a tener una concentración final de 0.3 M. Precipitar el cDNA con 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 17.-Dejar reposar a -20° C por 2 horas.
- 18.-Centrifugar a 12,000 rpm a 4° C por 30 minutos.
- 19.-Desechar los sobrenadantes y lavar la pastilla con etanol al 80%. Centrifugar a 12,000 rpm. a 4° C por 30 minutos
- 20.-Desechar los sobrenadantes.
- 21.-Redisolver la pastilla en 20 µl de TE pH= 8.
- 22.-Hacer un gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5x para verificar la cantidad y calidad del cDNA obtenido.
- 23.-Guardar el cDNA a -20° C.

4.3.5. EXTRACCION DE RNA TOTAL.

- 1.-Pesar 1 g. de tejido tanto tumoral como normal y homogenizarlos independientemente con 5 ml de amortiguador de homogenización.
- 2.-Adicionar lauril sarcosinato de sodio a una concentración final de 0.5% p/v y pasar el homogenado a través de una aguja del número 18 hasta eliminar la viscosidad.
- 3.-Agregar un volumen igual de solución D. Agitar y dejar en hielo 10 minutos.
- 4.-Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4° C.
- 5.-Recuperar la fase acuosa y precipitarla con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20° C durante 2 horas.
- 6.-Centrifugar a 10,000 rpm por 30 minutos a 4° C. Resuspender la pastilla en 1 ml de amortiguador de homogenización con lauril sarcosinato de sodio al 0.5% .
- 7.-Colocar en un tubo de ultracentrífuga 3.1 ml de CsCl 5.7 M/EDTA 0.01 M pH= 7.5. Colocar la solución del punto anterior sobre la solución de CsCl/EDTA con una jeringa con aguja del número 23.
- 8.-Centrifugar a 40,000 rpm por 24 horas a 20° C.
- 9.-Decantar los sobrenadantes y lavar la pastilla con etanol al 70%.
- 10.-Decantar el etanol y dejar secar a temperatura ambiente..
- 11.-Resuspender la pastilla en 325 µl de TE/SDS pH= 7.6 y adicionar 150 µl de TE pH= 7.6.
- 12.-Precipitar el RNA agregando 40 µl de acetato de sodio 3M pH= 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C por 2 horas.
- 13.-Centrifugar a 12,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Lavar la pastilla con etanol al 80% y secar a temperatura ambiente.

14.-Redissolver la pastilla en 50 μ l de agua estéril tratada con DEPC y guardar a -70°C . Si no se va a usar en un corto plazo precipitar la solución con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y guardar a -70°C .

15.-Hacer diluciones 1:100 y leer la absorbencia de estas diluciones a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 310 nm.

16.-Determinar la concentración de RNA sabiendo que: 1 unidad de U.A. a 260 nm = 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA.

17.-Determinar la pureza por medio de la relación de absorbencias obtenidas a 260 y 280 nm: 260/280.

4.3.6. ELECTROFORESIS DEL RNA.

1.- Preparar un gel desnaturizante de agarosa al 1.1%:

Para preparar 100 ml de gel de agarosa al 1.1%.

Agarosa	1.1 g.
HEPES-EDTA 10X	10 ml.
Agua estéril/DEPC	74.6 ml.
Formaldehído 37%	15.4 ml.
Bromuro de etidio	1 μ l.
(10 mg/ml)	

La agarosa se disuelve en el agua y el HEPES-EDTA. Se pesa y se calienta en horno de microondas hasta que la agarosa esté bien disuelta. Se reconstituye el peso perdido con agua estéril tratada con DEPC. Se deja enfriar hasta que se pueda tocar con la mano y entonces se agrega el formaldehído y el bromuro de etidio.

2.-Preparar las muestras

	Concentración final.
RNA	10 μg .
HEPES-EDTA	1x
Formaldehído	6%
Formamida	50%
Amortiguador Loading 6x	1x

El RNA se disuelve en el HEPES-EDTA, el formaldehído y la formamida y se calientan a 70° C por 10 minutos. Se saca y se coloca inmediatamente en hielo. Se le agrega el amortiguador Loading 6x tipo II.

3.-Cargar las muestras en el gel y correrlo a 75 V en el amortiguador de corrida por cuatro horas.

4.-Sacar el gel y ver las muestras en un transiluminador de luz UV.

4.3.7. TRANSFERENCIA A FILTROS DE NYLON.

1.-Enjuagar el gel desnaturalizante de agarosa varias veces en agua estéril tratada con DEPC.

2.-Cortar un pedazo de membrana de nylon y dos de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que el del gel. Colocarlas 5 minutos en agua estéril tratada con DEPC y despues otros 5 minutos en SSC 10x.

3.-Colocar un pedazo de papel Whatman 3MM sobre un soporte que sea más ancho y más largo que el gel.

4.-Colocar el soporte dentro de un recipiente y llenarlo con SSC 10x.

5.-Cuando el papel Whatman, que se encuentra sobre el soporte, se haya mojado completamente eliminar las burbujas de aire con una varilla de vidrio.

6.-Colocar el gel sobre el soporte en posición invertida. Asegurarse que no queden burbujas de aire entre el gel y el papel Whatman. Para eliminar las burbujas de aire usar una varilla de vidrio.

7.-Cortar la esquina inferior izquierda del gel y rodearlo con parafilm.

8.-Colocar la membrana de nylon sobre el gel y hacerle un corte en la esquina inferior izquierda que concuerde con la del gel. Asegurarse de que no queden burbujas de aire entre el gel y la membrana.

- 9.-Colocar sobre la membrana de nylon los dos pedazos de papel Whatman y eliminar todo el aire que haya entre la membrana y el papel con el rodillo de vidrio.
- 10.-Cortar toallas de papel ligeramente más pequeñas que la membrana y colocarlas sobre el papel Whatman hasta que alcancen una altura de 5 a 8 cm.
- 11.-Colocar una placa de vidrio sobre los papeles y sobre esta placa una pesa de 500 g.
- 12.-Dejar que los RNAs se transfieran por capilaridad durante 6 a 18 horas. Las toallas de papel se deben de ir cambiando a medida que se van mojando.
- 13.-Remover las toallas de papel y el papel Whatman.
- 14.-Con un lápiz marcar sobre la membrana de nylon la posición donde se encuentran los pozos del gel.
- 15.-Remover la membrana de nylon del gel y sumergirla en SSC 6x a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 16.-Colocar la membrana sobre papel Whatman y dejarla secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 17.-Colocar la membrana envuelta entre dos pedazos de papel Whatman y calentarla durante 2 horas a 80°C en el horno de vacío.

4.3.8. HIBRIDACION NORTHERN BLOT.

1.-Preparar el amortiguador de prehibridación el mismo día que se va a llevar a cabo la prehibridación. El amortiguador de prehibridación esta constituido por:

	Concentración final
Formamida	40%
SDS 10x	0.2%
EDTA 0.5 M	0.01 M
Reactivo Denhardt 50x	4x
PBS 0.6 M	0.12 M
DNA esperma de salmón	100 µg/ml
SSC 20x	2x

Se preparan 0.2 ml por cada cm² de membrana que se va a prehibridar.

El DNA de esperma de salmón se disuelve en 1 ml de agua estéril tratada con DEPC y se calienta a 100° C durante 5 minutos. En seguida se coloca en hielo otros 5 minutos y después se le agrega a la mezcla.

- 2.-Colocar la membrana de nylon dentro de una bolsa de plástico.
- 3.-Colocar la solución de prehibridación dentro de la bolsa y eliminar todo el aire.
- 4.-Sellar la bolsa y colocarla en un baño de agua a 42° C.
- 5.-Dejar prehibridando la membrana de 6 a 24 horas.

6.-Marcar con [α - 32 P] dCTP y por el método de "random primers" el cDNA que se va a usar en la hibridación. Para ello se prepara la siguiente mezcla:

cDNA	100 ng
Mezcla de iniciadores aleatorios	15 μ l
dATP	2 μ l
dGTP	2 μ l
dTTP	2 μ l
[α - 32 P] dCTP	5 μ l
Fragmento Klenow	1 μ l
Agua	cbp 50 μ l

7.-Mezclar el cDNA con el agua y calentar a 100° C por 5 minutos. Se saca e inmediatamente se coloca en hielo otros 5 minutos.

8.-Se le agrega la mezcla de iniciadores aleatorios, el dATP, dGTP y el dTTP y se mezclan.

9.-En la campana y detrás de una pantalla de acrílico se le agrega el [α - 32 P] dCTP y se mezcla con la punta de la pipeta.

10.-Agregar el fragmento Klenow y mezclar nuevamente con la punta de la pipeta.

11.-Dejar incubar la mezcla 2 horas a temperatura ambiente dentro de un recipiente de plomo que se encuentra en la campana detrás de la pantalla de acrílico.

12.-Media hora antes de que termine la incubación preparar una columna de sephadex G-50. Para ello colocar en el fondo de una jeringa de insulina un poco de fibra de vidrio estéril y después llenar la jeringa con el sephadex usando una pipeta pasteur estéril. Centrifugar la columna a 1,500 rpm. por 3 minutos a 4° C.

13.-Dentro de un tubo de centrifuga colocar un tubo eppendorf sin tapa y rotulado. Dentro de este mismo tubo colocar la columna de sephadex.

- 14.-Transcurridas dos horas, agregar a la mezcla, en la campana y detrás de la pantalla de acrílico, 5 μ l de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow y 100 μ l de TE pH = 8. Mezclar.
- 15.-Colocar los 155 μ l de mezcla dentro de la columna de sephadex y centrifugar a 1,500 rpm. por 3 minutos a 4° C.
- 16.-Comprobar con el contador, detrás de la pantalla de acrílico, la cantidad de radioactividad que se quedó en la columna y la que se recolectó en el tubo eppendorf. El porcentaje de incorporación debe de ser al menos del 50% .
- 17.-Con unas pinzas sacar el tubo eppendorf del tubo de centrifuga y taparlo.
- 18.-Hervir la sonda por 5 minutos. Para ello se coloca un vaso de precipitado con agua sobre una plancha calentadora la cual se coloca detrás de la pantalla de acrílico.
- 19.-Se coloca la sonda en hielo 5 minutos.
- 20.-Se saca la membrana de nylon del baño de agua y se le hace un pequeño corte a la bolsa por el cual se saca la mitad del amortiguador de hibridación.
- 21.-Se saca el aire que se pudiera haber formado dentro de la bolsa.
- 22.-Con una pipeta Gilson se mete dentro de la bolsa la sonda marcada.
- 23.-Se sella la bolsa y se coloca dentro de una caja de acrílico con tapa.
- 24.-Se mete la caja de acrílico en un baño de agua y se deja hibridando a 40° C por 24 horas.
- 25.-Transcurrido el tiempo, la hibridación se saca del baño de agua.
- 26.-En la campana y detrás de la pantalla de acrílico se abre la bolsa por una esquina.
- 27.-Se vacía el amortiguador de prehibridación con la sonda dentro de un tubo falcon. El tubo se coloca en un recipiente de plomo y se guarda en el congelador.

- 28.-Se mete a la bolsa 10 ml de solución SSC 2x y se lava la membrana.
- 29.-Se desecha esta solución en el bote para desechos radioactivos.
- 30.-Se abre la bolsa y se coloca la membrana en un recipiente que contenga SSC 2x. Se deja agitando durante media hora a temperatura ambiente.
- 31.-Se cambia la solución por solución nueva de SSC 2x y se deja agitando 30 minutos como en el paso anterior.
- 32.-Se cambia la solución por una solución de SSC 0.1x + SDS 0.1%.Se coloca el recipiente en un baño de agua a 50° C y se deja lavando por media hora.
- 33.-Se saca la membrana y se verifica con el contador si las esquinas de la membrana todavía contienen mucha radioactividad. Si ese es el caso se cambia la solución del recipiente y se vuelve a lavar por media hora en las mismas condiciones.
- 34.-Se coloca la membrana dentro de una bolsa de plástico y se sella la bolsa.

4.3.9. AUTORRADIOGRAFIA.

- 1.-En un cuarto oscuro se expone la membrana a dos films de rayos-X (X-OMAT AR). Para ello se usa un cassette que tenga pantallas intensificadoras. La membrana se coloca entre los dos films de rayos-X y se cierra el cassette.
- 2.-El cassette se envuelve en papel aluminio para evitar cualquier entrada de luz que pueda velar la placa.
- 3.-Se guarda el cassette a - 70° C por 2 ó 3 días.
- 4.-Se revela una de las dos placas fotográficas. Dependiendo como se vea esta placa se deja la otra exponiendo más tiempo o se revela.

4.3.10. REMOCION DE LA SONDA RADIOACTIVA DE LAS MEMBRANAS DE NYLON.

- 1.-Sumergir la membrana en una solución de SSPE 2x + 50% formamida. Dejarla en esa solución por 1 hora a 65° C.
- 2.-Enjuagar la membrana con SSPE 0.1x a temperatura ambiente. Permitir que la membrana se seque a temperatura ambiente colocándola sobre papel Whatman.
- 3.-Guardar las membranas envueltas en papel Whatman a temperatura ambiente.

4.3.11. CUANTIFICACION DENSITOMETRICA.

- 1.-La cuantificación densitométrica de la expresión de los diferentes genes en el tejido tumoral respecto al tejido control se lleva a cabo en un espectrofotómetro Quick Scan de Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA).

5. RESULTADOS.

5.1. AMPLIFICACION, DIGESTION ENZIMATICA Y PURIFICACION DE LOS cDNA.

Con el objeto de obtener las sondas correspondientes a los genes de c-myc, c-fos, c-Ki-ras y p53, con las cuales se realizaron las hibridaciones Northern blot, se llevó a cabo la amplificación, digestión enzimática y purificación de los cDNA. Para ello se obtuvieron cepas de *E. coli* DH 5 alfa las cuales se encontraban previamente transfectadas con los plásmidos que contienen el cDNA de p53, c-myc, c-fos y c-ki-ras. El cDNA de c-myc estaba inserto en el plásmido pBr322 (Morillon, 1992), c-fos en pSp65 (Morillon, 1992), c-Ki-ras en p640 (Morillon, 1992), y p53 en pC53-C1N3 (Harlow, et al., 1985). La Figura 7 muestra el DNA obtenido de los plásmidos después de llevar a cabo la amplificación. El primer carril corresponde al DNA del fago lambda digerido con Hind III, el cual se usa como marcador de peso molecular. Las bandas de DNA que se observan corresponden a fragmentos de: 23 kb, 9.42 kb, 6.56 kb, 4.36 kb, 2.32 kb y 2.03 kb. El tercer carril corresponde al plásmido que contiene el cDNA de p53, el cuarto carril corresponde al plásmido con c-Ki-ras inserto, el quinto carril al plásmido con c-fos y el sexto al plásmido con c-myc. Como se puede observar cada carril presenta diversas bandas debido a las diferentes formas de superenrollamiento presentes en la estructura de los plásmidos.

Se llevó a cabo la digestión enzimática de los plásmidos con enzimas de restricción y los cDNA obtenidos se purificaron por medio de electroelución. Los resultados obtenidos se observan en las Figuras 8, 9 y 10. Los carriles marcados con lambda corresponden al DNA del fago lambda digerido con Hind III, los carriles marcados con letras mayúsculas corresponden a los plásmidos sin digerir y los marcados con letra minúscula corresponden a los plásmidos digeridos.

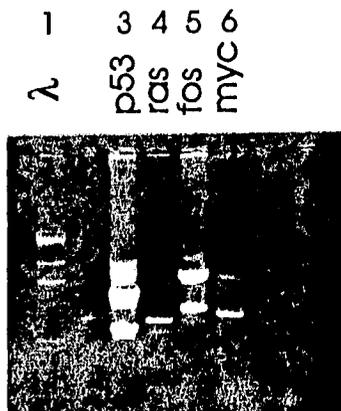


Fig. 7. Amplificación de los plásmidos con el cDNA de p53, c-Ki-ras, c-fos y c-myc.

En la Figura 8, el primer carril corresponde al DNA del fago lambda digerido, el cual nos sirve como marcador de masa molecular. En el segundo carril se observa el plásmido, sin digerir, que tiene inserto el cDNA de p53. El quinto carril se observa el plásmido, sin digerir, que contiene inserto el cDNA de c-fos y en el sexto carril se observa este mismo plásmido digerido. El cDNA de c-fos tiene un tamaño de 3.02 kb. En el décimo y doceavo carril se observa el plásmido, sin digerir, que tiene inserto el cDNA de c-myc y el onceavo carril se observa este mismo plásmido digerido. El cDNA de c-myc obtenido tiene un tamaño de 1.03 kb. En los carriles décimotercero y décimoquinto se observa el plásmido, sin digerir, que contiene inserto el cDNA de c-ki-ras, y en el carril décimocuarto se observa este mismo plásmido digerido. El cDNA de c-Ki-ras obtenido tiene un tamaño de 0.62 kb.

En la Figura 9 y 10 se observa, en el primer carril, el DNA del fago lambda digerido, el cual sirve como marcador de masa molecular. En el segundo carril, de la Figura 9, se observa el plásmido digerido que tenía inserto el cDNA de p53. En el segundo carril de la Figura 10 se observa el cDNA de p53 purificado por electroelución. El tamaño del cDNA de p53 es de 2.3 kb.

En la tabla 4 se indica el tamaño de los cDNA obtenidos por medio de este procedimiento.

TABLA 4. cDNA de los proto-oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras y del gen supresor de tumores p53.

cDNA	Tamaño (kb)
c-fos	3.02
c-myc	1.03
c-Ki-ras	0.62
p53	2.3

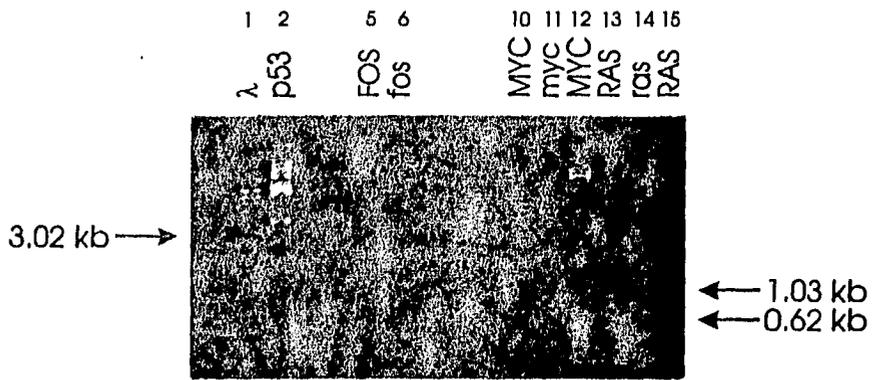


Fig. 8. Digestión enzimática de los plásmidos con los cDNA de c-fos, c-myc y c-Ki-ras.

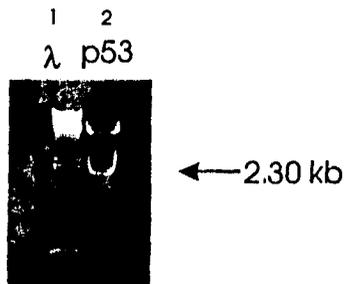


Fig. 9. Digestión enzimática del plásmido con el cDNA de p53.

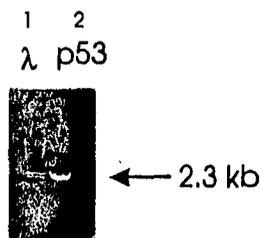


Fig. 10. Electroelución del cDNA de p53.

5.2. EXTRACCION Y PURIFICACION DEL RNA DE LAS BIOPSIAS.

Para poder determinar el grado de expresión de los oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras y del gen supresor de tumores p53 en tumores de pacientes con cáncer colorectal se llevó a cabo la extracción y purificación del RNA total. Para ello, se obtuvo de cada paciente una muestra de tejido tumoral y de tejido sano adyacente a la lesión. El tejido sano se utilizó como tejido control. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de haber sido obtenidos del paciente y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que fueron procesados. Se extrajo el RNA total de cada muestra, usando para ello tiocianato de guanidina y una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Posteriormente se purificó el RNA total por medio de un gradiente de cloruro de cesio.

Las Figuras 11 y 12 muestran las electroforesis de los RNAs totales purificados en un gel no desnaturizante y desnaturizante de agarosa respectivamente. En ellas se observan las subunidades 28s y 18s que corresponden a los RNA ribosomales. No se observa material degradado, lo cual nos indica que el RNA obtenido se encuentra íntegro.

La pureza del RNA obtenido se determinó por medio de la relación de absorbencias que presentan las muestras a 260 y 280 nm. La relación debe de ser cercana a 1.8. Así mismo,

se determinó la absorbencia a 310 nm, la cual nos indica la presencia de carbohidratos. En la Tabla 5 se muestra las lecturas de absorbencia obtenidas a 260, 280 y 310 nm, así como la relación de absorbencias a 260 nm/280 nm y los μg de RNA obtenidos por μl (se obtuvieron aproximadamente 50 μl por muestra).

TABLA 5. Relación de pureza y concentración de RNA total de tumores colorectales.

MUESTRA	260 nm	280 nm	310 nm	260/280	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
T70	0.679	0.359	0.003	1.89	2.74
C70	0.577	0.310	-0.001	1.86	9.33
T72	0.624	0.310	-0.009	2.01	5.02
C72	0.733	0.405	-0.002	1.81	2.96
T74	0.657	0.347	-0.007	1.89	10.54
C74	0.707	0.384	0.009	1.84	2.86
T76	0.436	0.226	-0.004	1.93	7.05
C76	0.475	0.253	0.007	1.88	1.92
T78	0.556	0.305	0.015	1.82	8.99
C78	0.953	0.522	0.017	1.82	3.85

Absorbencias determinadas a 260, 280 y 310 nm.

T = tumor, C = control.

Como se puede observar en la Tabla 5 todas las relaciones de absorbencia 260/280 nm fueron mayores de 1.8 y las lecturas a 310 nm son menores a 0.02 lo cual nos indica que los RNA obtenidos están puros.

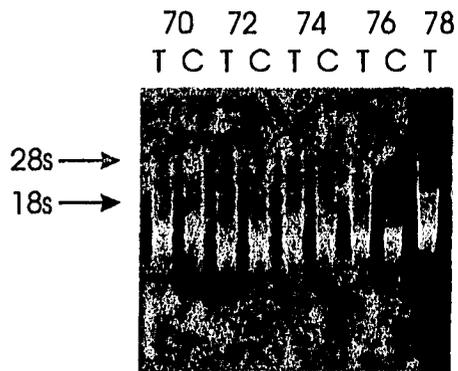


Fig. 11. RNAs de cáncer colorrectal (T) y de tejido sano (C) en gel no desnaturizante.

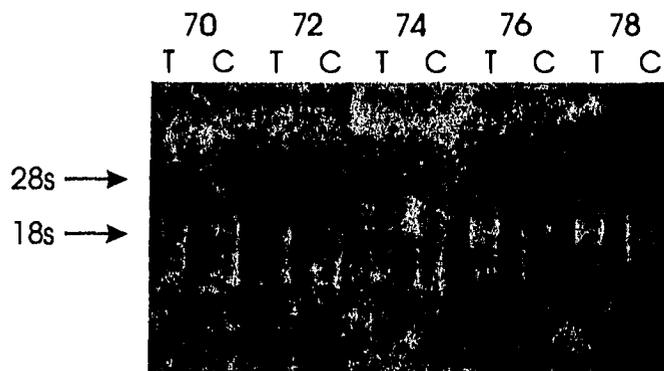


Fig.12. RNAs de cáncer colorrectal (T) y de tejido sano (C) en gel desnaturizante.

5.3. HIBRIDACION DE LOS RNA CON EL cDNA DE CADA GEN.

Para poder determinar la expresión de cada gen en el tejido tumoral, en relación al tejido normal, se llevó a cabo la hibridación del RNA total, por medio de la técnica de Northern Blot, con la sonda indicada. Los RNAs se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de hibridación utilizando sondas marcadas radioactivamente, las cuales se marcaron por el método de "Random Primers". Los resultados de las hibridaciones se observan en las Figuras 13, 15, 17 y 19. La intensidad de las señales en las autoradiografías fueron cuantificadas por medio de un análisis densitométrico. Las Figuras 14, 16, 18 y 20 muestran las densitometrías obtenidas y en los siguientes párrafos se presenta los resultados para cada uno de los genes estudiados. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Relación de la expresión del gen supresor de tumores p53 y de los oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras en carcinomas colorrectales respecto al tejido normal.

PACIENTE	p53	c-myc	c-fos	c-Ki-ras
70	1.25	1.57	4.40	2.85
72	1.76	1.57	0.85	0.49
74	1.25	1.62	7.66	0.46
76	4.41	3.55	4.85	0.84
78	2.73	2.28	6.77	0.85

p53. El mRNA de p53 aparece como una banda de 2.6 kb. en la autoradiografía del Northern blot (Figura 13). El análisis densitométrico (Figura 14) indicó que en los cinco tumores se sobreexpresa este gen (1.2 a 4.4 veces).

c-myc. En el análisis Northern blot el mRNA correspondiente a c-myc aparece como una banda de 2.3 kb (Figura 15). El análisis densitométrico (Figura 16) indicó que en los cinco tumores se sobreexpresa este gen de 1.5 a 3.5 veces. El tumor donde se expresó más este oncogen fue en T76, que es el mismo donde se obtuvo la mayor expresión de p53.



Fig. 13. Expresión del gen supresor de tumores p53 en cáncer colorrectal (T) y tejido sano (C).

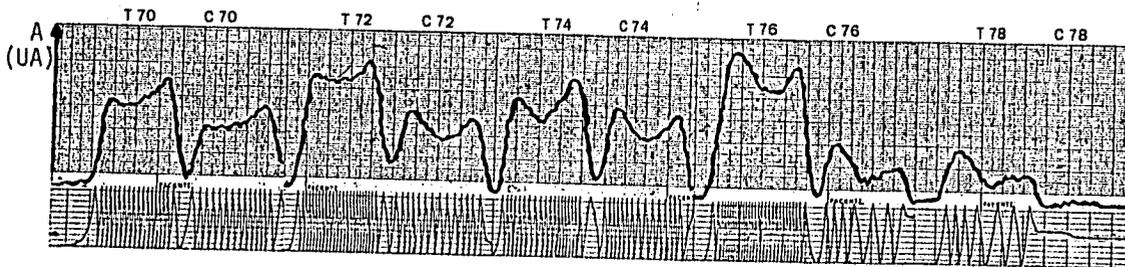


Fig. 14. Densitometría de la autorradiografía de p53. Contro (C), Tumor (T).



Fig. 15. Expresión del oncogen c-myc en cáncer colorrectal (T) y tejido sano (C).

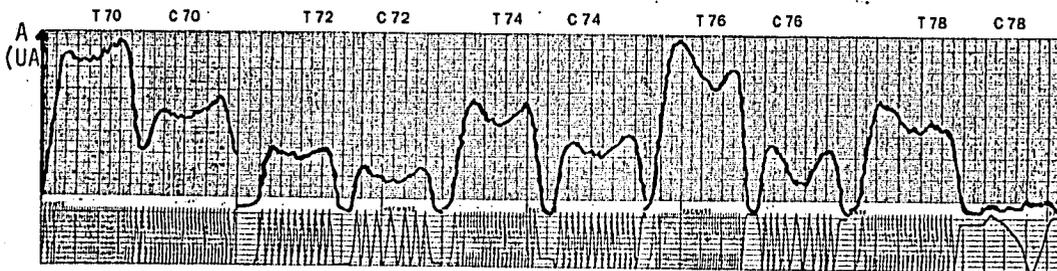


Fig. 16. Densitometría de la autorradiografía de c-myc. Control (C), Tumor (T).

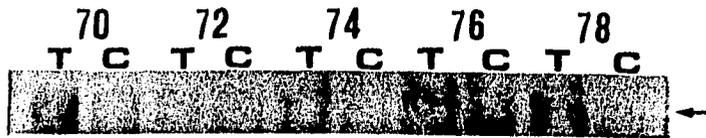


Fig. 17. Expresión del oncogen c-fos en cáncer colorrectal (T) y tejido sano (C).

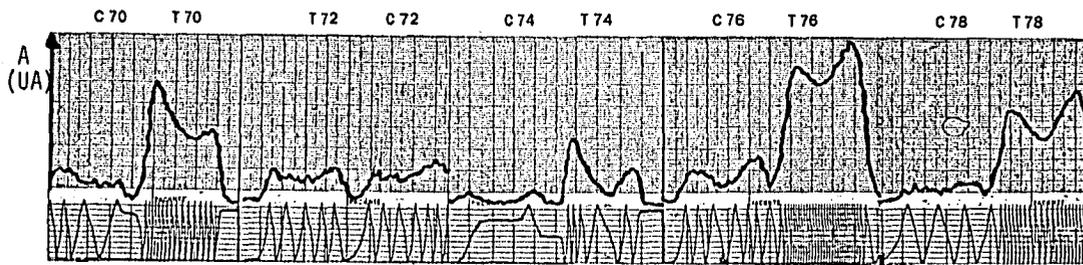


Fig. 18. Densitometría de la autorradiografía de c-fos. Control (C), Tumor (T).

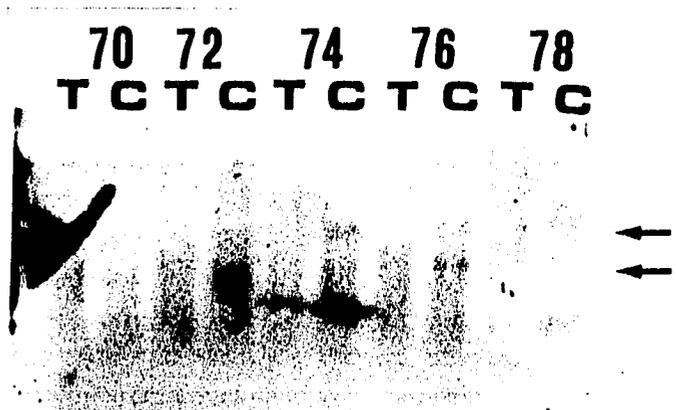


Fig. 19. Expresión del oncogen c-Ki-ras en cáncer colorrectal (T) y tejido sano (C).

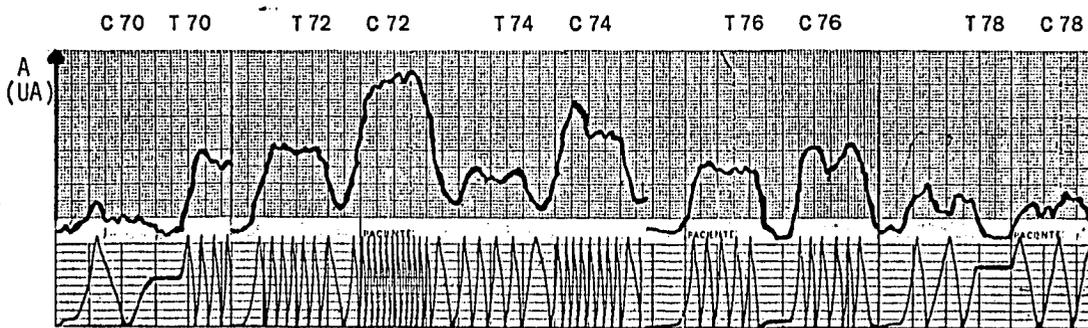


Fig. 20. Densitometría de la autorradiografía de c-Ki-ras. Control (C), Tumor (T).

c-fos. La banda de 2.2 kb que se observa en la Figura 17 corresponde al mRNA de *c-fos*. La expresión de este oncogen se cuantificó por densitometría (Figura 18). En 4 de los cinco casos (80%) se observó una sobreexpresión de este oncogen (4.4 a 7.6 veces), y en 1 caso (20%) este gen se expresó menos en el tejido tumoral que en el control (72). Es importante destacar que en el paciente en el que se observó la mayor expresión de este oncogen fue en el 74, el cual corresponde a una poliposis adenomatosa familiar (FAP).

c-Ki-ras. En la Figura 19 las bandas de 4.4 y 3.0 kb que se observan corresponden al mRNA de *c-ki-ras*. Este gen se subexpresa en 4 de los 5 pacientes (80%), y sólo en el caso 70 se sobreexpresa este gen 2.85 veces respecto al tejido control (Figura 20).

5.4. DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES.

Este estudio se llevó a cabo con muestras de cinco pacientes, que fueron obtenidas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las características clínicas de cada paciente (sexo, edad, grado de diferenciación, estadio de Dukes, invasividad, diagnóstico, recurrencia y muerte) se resumen en la Tabla 7.

5.5. GRADO DE EXPRESION DE CADA GEN ESTUDIADO Y SU CORRELACION CLINICA.

La correlación entre las alteraciones genéticas estudiadas y los datos clínicos de los pacientes se muestran en la Tabla 8. La discusión de las correlaciones encontradas se hará en el siguiente capítulo.

TABLA 7. Datos clínicos de los pacientes con cáncer colorrectal.

No	S	E	DIFEREN	D	INVASIVIDAD	RE	MU	DIAGNOSTICO
70	F	62	MODERA- DO	B2	SEROSA	NO	NO	CA. DE COLON DERECHO.
72	F	75	MODERA- DO	C3	SEROSA, TABIQUE RECTOVAGINAL, ESTROMA, GANGLIOS	?	NO	CA. DE RECTO
74	M	31	BIEN	*	NO	SI	NO	POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR
76	F	81	MODERA- DO	C2	SEROSA, TABIQUE RECTOVAGINAL, CERVIX, GANGLIOS	SI	NO	CA. DE RECTO.
78	M	84	POCO	B2	SEROSA, GANGLIOS	NO	SI	CA. DE COLON DERECHO.

No, Número de paciente; S, Sexo; E, Edad; DIFEREN., Grado de diferenciación; D, Estadío de Dukes; RE, Recurrencia; MU, Muerte; CA., Carcinoma; F, Femenino; M, Masculino; * La poliposis adenomatosa familiar no está considerada dentro de la clasificación de Dukes; ? No se sabe si tuvo recurrencia ya que el paciente no volvió a consulta.

Tabla 8. Correlación entre el grado de expresión de los genes y los datos clínicos de los pacientes.

EXPRES GEN	TOTAL	SEXO F/M	DIFER. P/MyB	LOCAL. D/I	DUKES AB/CD	REC. SI/NO	MUER. SI/NO
AUM. P53	5/5	3/2	1/4	3/3*	3/2	2/5	1/4
DIS.	0/5						
AUM. c-myc	5/5	3/2	1/4	3/3*	3/2	2/5	1/4
DIS.	0/5						
AUM. c-fos	4/5	2/2	1/3	3/2*	3/1	2/4	1/3
DIS.	1/5	1/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
AUM. c-ras	1/5	1/0	0/1	1/0	1/0	0/1	0/1
DIS.	4/5	2/2	1/3	2/3*	2/2	2/4	1/3

EXPRES GEN, Expresión del gen; AUM., Aumentado; DIS., Disminuido; F, Femenino; M, Masculino; DIFER., Grado de diferenciación; P, Pobrementemente diferenciado; MyB, Moderado y bien diferenciado; LOCAL., Localización; D, Derecho; I, Izquierdo; DUKES, Estadío de Dukes; AB, Estadío de Dukes A y B; CD, Estadío de Dukes C y D; REC., Recurrencia; MUER., Muerte; * La poliposis adenomatosa familiar se encontró localizada tanto en el colon izquierdo como en el derecho del paciente.

6. DISCUSION.

6.1. EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53 SE SOBREEXPRESA EN TODOS LOS TUMORES.

Como se puede observar en las figuras 13 y 14 y en la Tabla 6 el gen supresor de tumores p53 se sobreexpresa en todos los tumores en relación con su tejido control. En los pacientes 70 y 74, p53 se sobreexpresa 1.25 veces más en los tumores que en los controles. Es importante destacar que justamente estos dos pacientes son los que presentaron los tumores menos agresivos. El paciente 74 presentó una poliposis adenomatosa familiar bien diferenciada y sin invasividad y el paciente 70 presentó un cáncer de colon derecho, moderadamente diferenciado con una clasificación de Dukes B2 y solamente presenta invasividad a serosa (Tabla 7). Los tumores 72 y 76, a pesar de ser muy semejantes, presentan una gran diferencia en el grado de expresión de p53. Ambos tumores fueron cánceres de recto, moderadamente diferenciados y con invasividad a serosa, tabique rectovaginal y ganglios linfáticos. El tumor 72 es ligeramente más avanzado que el 76 ya que el 72 fue clasificado como un C3 mientras que el 76 como un C2 de la clasificación de Dukes. El tumor 72 presentó una sobreexpresión de 1.76 veces más en el tumor que en el tejido control y el 76 presentó la máxima sobreexpresión observada, de 4.41 veces. Es probable que el aumento en la expresión de p53 se haya debido a que esta paciente fue tratada con radioterapia antes de ser operada ya que se ha reportado (Kastan et al., 1991; Shaw et al., 1992; Kuerbitz et al., 1992; Lowe et al., 1993; Clarke et al., 1993; Hall et al., 1993; Chandrasekhar et al., 1994) que el tratamiento de diferentes tejidos celulares, tanto

normales como tumorales, con radiaciones provoca el aumento en la expresión de p53, tanto a nivel del mRNA como de la proteína, y la inducción de la muerte celular programada. Todos los otros pacientes no fueron tratados con radioterapia antes de ser operados. El paciente 78, el cuál presentó el tumor menos diferenciado, presentó una sobreexpresión de p53 de 2.73 veces. Este era un tumor con características similares al 70 ya que también era un cáncer de colon derecho, con clasificación de Dukes B2 y con invasión a serosa y ganglios linfáticos. Este fue el único caso en el que el paciente falleció.

Se ha reportado (Calabretta et al., 1986; van der Berg et al., 1989; Purdie et al., 1991; Peinado et al., 1993) que un 50%-60% de los carcinomas colorrectales sobreexpresan el gen de p53. Los grupos de Vogelstein y Perucho han llevado a cabo la secuenciación de este gen, que se está sobreexpresando, y demostraron que se encuentra mutado (Nigro et al., 1989; Baker et al., 1990; Peinado et al., 1990). Las mutaciones en el gen de p53 se agrupan en cuatro regiones. Estas cuatro regiones, que se encuentran dentro de los cuatro dominios más conservadas a lo largo de la evolución del gen, son: región A (codon 132-145), región B (codon 171-179), región C (codon 239-248) y región D (codon 272-286). La preponderancia de las mutaciones en estas regiones y su conservación a lo largo de la evolución son consistentes con la idea que estas cuatro regiones son dominios funcionales de la proteína de este gen. Así mismo se observó que el 91% de los carcinomas que presentan p53 mutado tienen una delección alélica del cromosoma 17p, en el cual se encuentra ubicado el gen de p53. A diferencia de los carcinomas colorrectales, en los adenomas las delecciones alélicas del cromosoma 17p son poco comunes, ya que ocurren en menos del 10% del total. De aquellos pocos adenomas que presentan delección alélica, el 67% presenta mutaciones en el alelo restante de p53. Con base en estas observaciones no se puede determinar cual evento ocurre primero, la delección alélica o la mutación del gen. El grupo de Vogelstein (Nigro et al., 1989; Baker et al., 1990) ha propuesto que las mutaciones puntuales preceden a la pérdida alélica en la mayoría de los casos. Una mutación en el gen de p53 probablemente disminuya el nivel de la proteína funcional a través de un efecto dominante negativo. La oligomerización de la proteína mutada con la proteína tipo silvestre puede evitar que la proteína tipo silvestre interactúe con otros factores celulares críticos para su función normal. De esta forma las mutaciones puntuales le darían a la célula una ventaja de crecimiento mayor que aquella que resulta de la disminución cuantitativa de la proteína normal lo cual ocurre cuando se pierde uno de los dos alelos de p53. Una vez que un alelo de p53 ha sufrido una mutación puntual, el alelo restante rápidamente se pierde. Con respecto a la proteína de p53, por medio de inmunohistoquímica sólo se ha podido detectar a la proteína mutada de p53, ya que la proteína tipo silvestre, por tener una corta vida media,

no se ha podido detectar por medio de esta técnica. Se ha reportado que la proteína de p53 mutada se sobreexpresa en los tejidos de cáncer de colon con respecto al tejido sano (Remvikos et al., 1990; Morimoto et al., 1991; Scott et al., 1991; Yamaguchi et al., 1992a; Martin et al., 1992; Yamaguchi et al., 1992b). La proteína de p53 mutada se ha encontrado en el 42%-67% de los carcinomas de colon. No se ha encontrado relación entre la presencia de esta proteína con el tipo histológico, el tamaño y grado de diferenciación del tumor, estadio de Dukes, invasión linfática y venosa ni con metástasis a hígado y ganglios linfáticos. Sin embargo, se ha encontrado que los pacientes que no expresan esta proteína (p53 mutada) tienen un mejor pronóstico que aquellos que la presentan. Se ha observado que del 3.3%-5.9% de las personas que no presentaron p53 mutado tienen recurrencia de la enfermedad, mientras que los pacientes que sobreexpusieron esta proteína tienen 20.9%-23.8% de recurrencia. Así mismo, los análisis de supervivencia de los pacientes revelaron una fuerte asociación entre el grado de expresión de p53 y el tiempo de supervivencia después de haber sido diagnosticado. La supervivencia a 3 y 5 años de pacientes que no presentaron la proteína de p53 mutada fue de 80%-96.7% y 56%-67.2% respectivamente, y la de los pacientes que si presentaron la proteína de p53 mutada en ese mismo lapso fue de 50%-61.8% y 24%-42.2% respectivamente. También se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de la proteína de p53 mutado y la localización del tumor. El 71.4% de los tumores del colon izquierdo presentan la proteína mutada mientras que solamente el 42.1% de los tumores de colon derecho la presentan (Remvikos et al., 1990; Morimoto et al., 1991; Scott et al., 1991; Yamaguchi et al., 1992a; Martin et al., 1992; Yamaguchi et al., 1992b).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo que está reportado en la literatura. En este estudio todos los tumores presentaron sobreexpresión del gen de p53 con respecto a su tejido normal. No se encontró correlación entre el grado de expresión de p53 y la edad, sexo, grado de diferenciación, invasividad, localización y estadio de Dukes del tumor. Es importante recalcar que los pacientes con mayor expresión del mRNA de p53 tuvieron un peor pronóstico. El paciente 76, que presentó la mayor sobreexpresión de 4.41 veces presentó recurrencia localizada en pared pélvica y periné. El paciente 78, que presentó una sobreexpresión de 2.73 murió pocos días después de la operación. El paciente 72, que presentó una sobreexpresión de 1.76 veces no se sabe si tuvo recurrencia o no ya que no volvió a consulta. De los pacientes 70 y 74 que presentaron una sobreexpresión de 1.25 veces sólo el paciente 74 presentó recurrencia ya que se le han encontrado pequeños polipos en el recto. El paciente 70, hasta la fecha, no ha presentado recurrencia. Con este estudio se pudo determinar que el gen de p53 es sobreexpresado entre 1.25 y 4.41 veces en

los tejidos tumorales con respecto al tejido normal. Sin embargo, no podemos decir si este gen que se está sobreexpresando es normal o presenta alguna mutación (este estudio se efectuará en el futuro). Sin embargo, de acuerdo a los reportes encontrados esperaríamos que el gen de p53 esté mutado (Nigro et al., 1989; Baker et al., 1990; Peinado et al., 1990).

6.2. EL ONCOGEN c-myc SE SOBREENPRESA EN TODOS LOS TUMORES.

De las figuras 15 y 16 y de la tabla 6 se observa que el oncogen c-myc se sobreexpresa en todos los tejidos tumorales en relación con su tejido control. En el paciente 76 se observó la mayor sobreexpresión de este gen (3.55 veces), el cual presenta también la mayor sobreexpresión de p53 (4.41 veces). Como ya se mencionó anteriormente, este tumor presenta características muy similares al 72, sin embargo, se encontró una gran diferencia entre el grado de expresión de este oncogen en los dos tumores. En el tumor 72 se observó una sobreexpresión de solo 1.57 veces, que es la más baja encontrada en este estudio. El paciente 78, el cual presentó el tumor menos diferenciado, presentó una sobreexpresión de 2.28 veces. Como se recordará, este tumor presenta características muy similares a las del tumor 70. Sin embargo, el tumor 70 presentó un grado de expresión de este oncogen similar al del 72 (sobreexpresión de 1.57 veces). El paciente 74, el cual presentó el único tumor benigno de este estudio, ya que se trató de una poliposis adenomatosa familiar (FAP), presentó una sobreexpresión de 1.62 veces.

En diversos estudios se ha reportado que el mRNA de c-myc se sobreexpresa en 60%-80% de los carcinomas colorrectales estudiados con respecto a su tejido normal (Calabreta et al., 1985; Erisman et al., 1985; Rothberg et al., 1985; Yokota et al., 1986; Monnat et al., 1987; Sikora et al., 1987; Tsuboi et al., 1987; Erisman et al., 1988; Finley et al., 1989; Imaseki et al., 1989; Nagai et al., 1992; Smith et al., 1993). Los resultados reportados en estos estudios indican que el gen de c-myc se sobreexpresa de 2 a 400 veces con respecto al tejido normal, pero no se ha encontrado que exista rearrreglo del gen y solamente en un bajo porcentaje (6%-10%) se ha encontrado amplificado el gen (Yokota et al., 1986, Nagai et al., 1992). Se piensa que este aumento en la expresión de c-myc se debe a la pérdida de represión de la transcripción por la delección de la región no traducida en el extremo 5' y la presencia de promotores anormales en las células malignas (Smith et al., 1993). No se ha encontrado que exista correlación entre la sobreexpresión de este gen y la

edad, sexo y sobrevivencia del paciente, recurrencia de la enfermedad, tamaño, localización, estadio de Dukes, invasividad a ganglios linfáticos y grado de diferenciación del tumor.

Los resultados que obtuvimos en el estudio que realizamos en esta población de tumores con respecto a la expresión de c-myc concuerdan con los datos reportados en la literatura. Es importante recalcar que el grado de sobreexpresión que encontramos fue de 1.57-3.55 veces, la cual es menor a los datos reportados en la literatura (2-400 veces). No se encontró correlación entre la sobreexpresión de c-myc y el sexo y edad del paciente, recurrencia de la enfermedad, grado de diferenciación, estadio de Dukes, invasividad y localización del tumor.

6.3. EL ONCOGEN c-fos SE SOBREEXPRESA EN CUATRO DE LOS CINCO TUMORES ESTUDIADOS.

De las figuras 17 y 18 y de la tabla 6 se observa que el oncogen de c-fos se sobreexpresa en 4 de 5 de los tumores estudiados. En el tumor 74, el único tumor benigno, se encontró la mayor expresión de este gen (esta sobreexpresado 7.66 veces respecto al tejido normal). En el tumor 78, el cual es el menos diferenciado, se observó una sobreexpresión de 6.77 veces en relación al tejido normal. El tumor 70, que presenta características muy similares al 78, presentó una sobreexpresión de 4.40 veces en relación al tejido normal. El tumor 76, el cual es más invasivo que el 70, 74 y 78 presenta una sobreexpresión de 4.85 veces respecto al epitelio normal, y el tumor 72, el cual presenta características muy parecidas al 76, es el único en el que el oncogen c-fos se subexpresa con respecto al tejido normal.

En la literatura existen pocos reportes de la expresión que presenta este oncogen en tumores colorrectales (Monnat et al., 1987; Nagai et al., 1992). Se ha reportado que el oncogen c-fos se sobreexpresa, a nivel de mRNA, en un 17%-43% de los tumores estudiados, y esta sobreexpresión es de 2 a 10 veces mayor respecto al epitelio normal. Solo en un 3% de estos tumores se ha observado amplificación del gen. Así mismo, se ha reportado (Nagai et al., 1992) que en 13% de los tumores estudiados la expresión de c-fos se encuentra disminuida. Con respecto a la sobreexpresión de este oncogen en adenomas, Monnat et al. reportaron que en 17% (1 de 6 casos) de los adenomas estudiados se sobreexpresa c-fos 3 veces respecto al tejido normal. En el mismo adenoma se observó una

sobreexpresión de c-myc de más de 100 veces respecto al tejido normal. Los autores no han encontrado una correlación entre el grado de expresión de c-fos con el sexo y edad del paciente, estadio de Dukes, invasividad a nódulos linfáticos o tamaño del tumor.

En el presente estudio se encontró que en el 80% de los casos estudiados se sobreexpresa el oncogen c-fos. Tres de estos casos corresponden a carcinomas colorrectales y uno a una poliposis adenomatosa familiar. Solamente en un caso (20%) se observó una disminución en la expresión de este oncogen, el cual correspondía a un cancer de recto. No se encontró correlación entre el grado de expresión de c-fos con la edad y sexo del paciente, grado de diferenciación, invasividad, recurrencia y estadio de Dukes del tumor. Sin embargo, es interesante recalcar que en el caso en el que se observa la mayor sobreexpresión de este oncogen es precisamente en el adenoma, el cual, a diferencia de todos los demás tumores estudiados, es el único que fue clasificado como un tumor benigno.

6.4. EL ONCOGEN c-Ki-ras SE SUBEXPRESA EN CUATRO DE LOS CINCO TUMORES Y SE SOBREEXPRESA SOLAMENTE EN UN TUMOR.

A diferencia de los otros genes estudiados, c-Ki-ras es el único en el que se observó que su expresión en el tejido tumoral es menor que en el tejido normal en la mayoría de los casos (80%). En el tumor en el que presentó la menor expresión fue en el tumor 74 que corresponde a la poliposis adenomatosa familiar. En este tumor la expresión de c-Ki-ras fue de 0.46 veces respecto al tejido normal. El tumor 72 que es el más avanzado, de acuerdo a la clasificación de Dukes, presentó una subexpresión de 0.49 veces respecto al tejido normal, mientras que el tumor 76 (que como se recordará presenta características parecidas al 72) presenta una expresión de c-Ki-ras muy parecida al epitelio normal, ya que solamente se subexpresa 0.84 veces menos. El tumor 78 también presenta una expresión de c-Ki-ras muy parecida al epitelio normal ya que solamente se subexpresó en 0.85 veces menos. El único tumor en el que se observó una sobreexpresión de este gen fue en el tumor 70. En este tumor el oncogen c-Ki-ras se sobreexpresó 2.85 veces respecto al tejido normal.

Los estudios realizados con respecto a c-Ki-ras se han enfocado en las mutaciones puntuales que presenta este gen. Se ha determinado que aproximadamente en el 50% de los carcinomas colorrectales y en un porcentaje similar de adenomas de más de 1 cm en tamaño

presentan mutaciones en el gen de c-Ki-ras (Capon et al., 1983; Forrester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988; Nagata et al., 1990; Sasaki et al., 1990; Capella et al., 1991). Los codones donde más frecuentemente ocurren mutaciones son los codones 12, 13 y 61. Se ha observado que el gen c-Ki-ras no solamente se activa por mutaciones puntuales, ya que se han encontrado cambios en su nivel de expresión, tanto a nivel del mRNA como de la proteína, en los tumores colorrectales respecto al tejido normal adyacente (Gallick et al., 1985; Monnat et al., 1987). En el 36% de los carcinomas colorrectales se observó una sobreexpresión de 3 a 7 veces del mRNA de c-Ki-ras. En pólipos se observó que solamente el 16.66% presentaban una sobreexpresión de 6 veces del mRNA de este gen, mientras que en las metástasis se encontró sobreexpresado este gen en un 50% de muestras (Monnat et al., 1987). Con respecto a la proteína, se ha encontrado que en el 53% de los tumores colorrectales tienen niveles aumentados (de 3 a > 10 veces respecto al epitelio normal) de la proteína de c-Ki-ras. El 89% de estos tumores que presentaron niveles elevados de la proteína correspondían a los estadios B y C de la clasificación de Dukes. De los cinco tumores que correspondían al estadio D solo 1 (20%) presentó mayor expresión de la proteína. De las metástasis estudiadas en el 100% se encontró un nivel reducido de expresión de la proteína, sin importar el sitio en el que se encontrara la metástasis. Estos datos sugieren que la elevación de la expresión de ras puede ser un evento común en las primeras etapas del tumor y a medida que evoluciona se presentan niveles menores de este gen. Esta hipótesis ha sido apoyada por el descubrimiento de que en el 100% de las metástasis de los tumores colorrectales primarios se ha observado una disminución en el nivel de la proteína de este gen (Gallick et al., 1985).

A diferencia de lo reportado en la literatura, en el presente estudio se encontró que la mayoría de los tumores estudiados (80%) el oncogen c-Ki-ras se encuentra subexpresado respecto al epitelio normal. Dos de estos tumores (76 y 78) presentaron una expresión de c-Ki-ras, aunque menor, muy parecido al presentado por el epitelio normal. De estos tumores, uno correspondía al estadio C2 y otro al estadio B2 de la clasificación de Dukes. Los tumores 72 y 74, correspondientes a los estadios C3 de la clasificación de Dukes y a la poliposis adenomatosa familiar, son los que presentan una menor expresión de este oncogen. El único tumor que presentó una sobreexpresión de c-Ki-ras fue el tumor 70, que corresponde al estadio B2 de la clasificación de Dukes. De lo anterior se observa que en los tumores estudiados en el presente trabajo no existe una correlación entre el grado de

expresión de este gen y el estadio de Dukes (B2, C2 y C3) que presentan dichos tumores. Así mismo, tampoco se encontró una correlación entre el grado de expresión de este oncogen y la edad y sexo del paciente, grado de diferenciación, invasividad, recurrencia y localización del tumor.

7. CONCLUSIONES.

Se ha reportado alteraciones de varios oncogenes en una gran variedad de tumores, incluyendo el cáncer colorrectal. Estas observaciones, y la correlación que existe entre la progresión del neuroblastoma y la amplificación del gen N-myc establecieron la posibilidad de que las alteraciones en los proto-oncogenes pudieran ser usados como factores de diagnóstico y/o pronóstico en cáncer.

En este estudio se ha comparado la expresión de los oncogenes c-myc, c-fos y c-Ki-ras y del gen supresor de tumores p53 en tumores colorrectales con respecto al epitelio normal adyacente. Se observó una expresión elevada de c-myc en 100% de los casos, de c-fos en 80% de los casos y de p53 en 100% de los casos estudiados en comparación con el tejido normal. Así mismo, se observó que en 80% de los casos estudiados, el oncogen c-Ki-ras se encuentra subexpresado respecto al tejido control. No se encontró correlación entre la alteración en la expresión de c-myc, c-fos, c-Ki-ras y p53 con las características de los pacientes (sexo y edad), recurrencia de la enfermedad, grado de diferenciación, estadio de Dukes, invasividad o localización del tumor, lo cual indica que no existe una correlación estricta entre el nivel de expresión de estos genes y la progresión de los tumores colorrectales estudiados.

Sin lugar a duda, las alteraciones de c-myc, c-fos, c-Ki-ras y p53 presentadas en este estudio tienen una gran importancia biológica en la etiología de los tumores colorrectales, sin embargo, estas alteraciones moleculares no pueden ser usadas para pronosticar el resultado final de la enfermedad.

8. BIBLIOGRAFIA.

Baker, S.J., Peisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K.V., Hamilton, S., Vogelstein, B. p53 Gene Mutation Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research* 50, 7717-7722 (1990).

Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein that Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217 (1991).

Burnstein, M.J. Dietary Factors Related to Colorectal Neoplasms. *Surgical Clinics of North America* 73 13-29 (1993).

Calabretta, B., Kaczmarek, L., Ming, P.M.L., Au, F., Ming, S.-C. Expression of c-myc and Other Cell Cycle-Dependent Genes in Human Neoplasia. *Cancer Research* 45, 6000-6004 (1985).

Calabretta, B., Kaczmarek, L., Torelli, S.L., Ming, G., Ming-S., P.L., Mercer, E. Growth-Dependent Expression of Human Mr 53,000 Tumour Antigen Messenger RNA in Normal and Neoplastic Cells. *Cancer Res.* 46, 6738-5742 (1986).

Capon, D.J., Seeburg, P.H., McGrath, J.P., Hayflick, J.S., Edman, U., Levinson, A.D., and Goeddel, D.V. Activation of Ki-ras 2 Gene in Human Colon and Lung Carcinomas by Two Different Point Mutations. *Nature* 304, 507-513 (1983).

Capella, G., Cronauer-Mitra, S., Peinado, M.A., and Perucho, M. Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the c-K-ras Gene in Human Tumors. *Environmental Health Perspectives* 93, 125-131 (1991).

Chandrasekhar, N.G., Baek, J.H., Shin, K.H., Cherrick, H.M., Park, N.H. Effect of UV-Irradiation on Cell Cycle Viability and the Expression of p53, gadd 153 and gadd 45 Genes in Normal and HPV-Immortalized Human Oral Keratinocytes. *Oncogene* 9, 1819-1827 (1994).

Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., Wyllie, A.H. Thymocytes Apoptosis Induced by p53 Dependent and Independent Pathways. *Nature* 362, 849-852 (1993).

Cole, M.D. The myc Oncogene: Its Role in Transformation and Differentiation. *Ann. Rev. Genet.* 20, 361-384 (1986).

Curran, T., Abate, C., Cohen D.R., MacGregor P.F., Rauscher III, Sonnenberg, J.L., Connor, J.A., Morgan, J.I. Inducible Proto-oncogenes Transcription Factors: Third Messengers in the Brain ? Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LV. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.p. 225-234 (1990).

Curran, T., Franza, B.R. Fos and Jun : The AP-1 Connection. *Cell* 55,395-401 (1988).

Curran, T., van Beveren, C., Ling, N., Verma, I.M. Viral and Cellular fos Proteins are Complexed with a 39,000 Cellular Protein. *Mol. Cell. Biol.* 5, 167-172 (1985).

Dang, C.V., McGuire, M., Buckmire, M., Lee, W.M.F. Involvement of the "Leucine Zipper" Region in the Oligomerization and Transforming Activity of Human c-myc Protein. *Nature* 337, 664-666 (1989).

Dwarki, V.J., Montminy, M., Verma, I.M. Both the Basic Region and the "Leucine Zipper" Domain of the Cyclic AMP Responsive Element Binding (CREB) Protein are Essential for Transcriptional Activation. *EMBO J.* 9, 225-232 (1990).

Eisenman, R.N., Tachibana, C.Y., Abrams, H.D., and Hann, S.R. v-myc, and the c-myc Encoded Proteins are Associated with the Nuclear Matrix. *Mol. Cell. Biol.* 5, 114-116 (1985).

Erisman, M.D., Rothberg, P.G., Diehl, R.E., Morse, C.C., Spandorfer, J.M., and Astrin, S.M. Deregulation of c-myc Gene Expression in Human Colon Carcinoma is not Accompanied by Amplification or Rearrangement of the Gene. *Molecular and Cellular Biology* 5, 1969-1976 (1985).

Erisman, M.D., Litwin, S., Keidan, R.D., Comis, R.L., Astrin, S.M. Noncorrelation of the Expression of the c-myc Oncogene in Colorectal Carcinoma with Recurrence of Disease or Patient Survival. *Cancer Research* 48, 1350-1355 (1988).

Evan, G.I. The myc Oncogene. In *Genes and Cancer* (ed. D. Carney and K. Sikora). John Wiley & Sons Ltd. p.p. 31-42 (1990).

Fearon, E.R., Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767. (1990).

Finley, G.G., Schulz, N.T., Hill, S.A., Geiser, J.R., Pipas, J.M., Meisler, A.I. Expression of the myc Gene Family in Different Stages of Human Colorectal Cancer. *Oncogene* 4, 963-971 (1989).

Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W.E., and Perucho, M. Detection of High Incidence of K-ras oncogenes during Human Colon Tumorigenesis. *Nature* 327, 298-303 (1987).

Gallick, G.E., Kurzrock, R., Kloetzer, E.S., Arlinghaus, R.B., and Gutterman J.U. Expression of p21ras in Fresh Primary and Metastatic Human Colorectal Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1795-1799 (1985).

Ginsberg, D., Mehta, F., Yaniv, M., and Oren, M. Wild-type p53 can Down Modulate the Activity of Various Promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9979-9983 (1991).

Gonzalez, G.A., Yamamoto, K.K., Fischer, W.H., Karr, D., Menzel, P., et al. A cDNA for cAMP-Regulated Nuclear Factor CREB Predicts Multiple Phosphorylation Sites. *Nature* 337, 749-752 (1989).

Hall, P.A., McKee, P.H., Menage, H. du P., Dover, R., Lane, D.P. High Levels of p53 Protein in UV-Irradiated Normal Human Skin. *Oncogene* 8, 203-207 (1993).

Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., Leder, P. c-Jun Dimerizes with Itself and with c-Fos, forming Complexes of Different DNA Binding Affinities. *Cell* 55, 917-924 (1988).

Harlow, E., Williamson, N.M., Ralston, R., Helfman, D.M., and Adams, T.E. Molecular Cloning and In Vitro Expression of a cDNA Clone for Human Cellular Tumor Antigen p53. *Molecular and Cellular Biology* 5, 1601-1610 (1985).

Herrera, L. Luna, P., Villareal, J.R., Brown, M., Sorrentino, J., and Khalek Y. Perspectives in Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Oncology Supplement* 2, 92-103 (1991).

Hope, I.A., and Struhl, K. GCN4, a Eukaryotic Transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* 6, 2781-2784 (1987).

Imaseki, H., Hayashi, H., Taira, M., Ito, Y., Tabata, Y., Onoda, S., Isono, K., Tatibana, M. Expression of the c-myc Oncogene in colorectal Polyps as a Biological Marker for Monitoring Malignant Potential. *Cancer* 64, 704-709 (1989).

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research* 51, 6304-6311 (1991).

Kelly, K. The Regulation and Expression of c-myc in Normal and Malignant Cells. *Ann. Rev. Immunol.* 4, 317-338 (1986).

Kouzarides, T., and Ziff, E. The Role of Leucine Zipper in the fos-jun Interaction. *Nature* 336, 646-651 (1988).

Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. Wild-Type p53 is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7491-7495 (1992).

Landschultz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. The Leucine Zipper Protein: a Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Protein. *Science* 240, 1759-1764 (1988).

Lemoine, N.R. The c-ras Oncogenes and GAP. *En Genes and Cancer* (ed. D. Carney and K. Sikora). John Wiley & Sons Ltd. p.p. 19-29 (1990).

Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. p53 is Required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Nature* 362, 847-848 (1993).

Ludlow, J.W. Interactions Between SV40 Large-Tumor Antigen and the Growth Suppressor Protein pRB and p53. *FASEB J.* 7, 866-871 (1993).

McCormick, F. ras Oncogenes. *En Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer.* (ed. Weinberg R.A.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 125-145 (1989).

Milsom, J.W. Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America* 73, 1-11 (1993)

Monnat, M., Tardy, S., Saraga, P., Diggelmann, H., and Costa J. Prognostic Implications of Expression of the Cellular Genes Myc, Fos, Ha-Ras and Ki-Ras in Colon Carcinoma. *Int. J. Cancer* 40, 293-299 (1987).

Moran, E. Interaction of Adenoviral Proteins with pRB and p53. *FASEB J.* 7, 880-885 (1993).

Morillon, I.R. Expresion de Alfafetoproteína y los oncogenes c-fos, c-myc y c-Ki-ras En Carcinoma Colorectal Humano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (1992).

Morimoto, H., Monden, T., Miyushi, Y., Kawasaki, Y., Nakanishi, H., Shimanu T., Mori, T. Expression of p53 and Hsp in Colorrectal Tumors: an Immunohistochemical Study. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 92, 1094-1097 (1991).

Nagai, M.A., Habr/Gama, A., Oshima, C.T.F., and Brentani, M.M. Association of Genetic Alterations of c-myc, c-fos, and c-Ha-ras Proto-oncogenes in Colorectal Tumors. *Dis. Colon Rectum* 35, 444- 451 (1992)

Nagata, Y., Abe, M., Kobayashi, K., Yoshida, K., Ishibashi, T., Naoe, T., Nakayama, E., and Shiku, H. Glycine to Aspartic Acid Mutations at Codon 13 of the c-Ki-ras Gene in Human Gastrointestinal Cancer. *Cancer Research* 50, 480-482 (1990).

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F.S., Weston, A., Modali, R., Harris, C.C., Vogelstein, B. Mutations in the p53 Gene Occur in Diverse Human Tumour Types. *Nature* 342, 705-708 (1989).

O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. Evidence that the Leucine Zipper is a Coiled Coil. *Science* 243, 538-542 (1989).

Peinado, M.A., Fernandez-Renart, M., Capella, G., Wilson, L., Perucho, M. Mutations in the p53 Suppressor Gene do not Correlate with c-K-ras Oncogene Mutations in Colorectal Cancer. *Int. J. Oncology* 2, 123-134 (1993).

Purdie, C.S., O'Grady J., Piris, J., Wyllie, A.H., Bird, C.C. p53 Expression in Colorectal Tumours. *Am. J. Pathol.* 138, 807-813 (1991).

Ransone, L.J., and Verma, I.M. Nuclear Proto-oncogenes Fos and Jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 539-557 (1990).

Ratner, L., et al. Oncogenes: Their Role in Neoplastic Transformation. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 419-449 (1985).

Remykios, Y., Tominaga, O., Hammel, P., Laurent-Puig, Salmon, R.J., Dutrillaux, B., Thomas, G. Increased p53 Protein Content of Colorectal Tumours Correlates with Poor Survival. *J. Cancer* 45, 450-456 (1990).

Rothberg, P.G., Spandorfer, J.M., Erisman, M.D., Staroscik, R.N., Sears, H.F., Peterson, R.O., Astin, S.M. Evidence that c-myc Expression Defines Two Genetically Distinct Forms of Colorectal Adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 52, 629-632 (1985).

Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W., Verma, I.M. Direct Interaction between fos and jun Nuclear Oncoproteins: Role of the Leucine Zipper Domain. *Nature* 336, 692-695 (1988b).

Sasaki, M., Sugio, K., and Sasazuki, T. K-ras Activation in Colorectal Tumors From Patients with Familial Polyposis Coli. *Cancer* 65, 2576-2579 (1990).

Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., Verma, I.M. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogen fos. *Nature* 334, 314-319 (1988a).

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136 (1990).

Scott, N., Sagar, P., Stewart, J., Blair, G.E., Dixon, M.F., Quirke, P. p53 in Colorectal Cancer: Clinicopathological Correlation and Prognostic Significance. *Br. J. Cancer* 63, 317-319 (1991).

Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G.P., Momand, J., Horikosh, N., Weinmann, R., Levine, A.J., and Shenk T. Wild-type p53 Binds to the TATA Binding Protein and Represses Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12028-12032 (1992).

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., Costa, J. Induction of Apoptosis by Wild-Type p53 in a Human Colon Tumor-Derived Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4495-4499 (1992).

Sikora, K., Chan, S., Evan, G., Gabra, H., Markham, N., Stewart, J., Watson, J. c-myc Oncogene Expression in Colorectal Cancer. *Cancer* 59, 1289-1295 (1987).

Smith, D.R., Myint, T., and Goh, H.-S. Over-expression of the c-myc Proto-oncogene in Colorectal Carcinoma. *Br. J. Cancer* 68, 407-413 (1993).

Takahashi, T., Mori, T., and Moossa, A.R. Tumors of the Colon and Rectum: Clinical Features and Surgical Management. *En Comprehensive Textbook of Oncology. Williams and Wilkins.* p.p. 904- (1991).

Trainer, D.L., Kline, T., McCabe, F.L., Faucerre, L.F., Feild, J., Chaikin, M., Anzano, M., Rieman, D., Hoffstein, S., Li, D., Gennaro, D., Buscarino, C., Lynch, M., Poste, G. and Greig, R. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Cancer* 41, 287-296 (1988).

Tsuboi, K., Hirayoshi, K., Takeuchi, K., Sabe, H., Shimada, Y., Ohshio, G., Tobe, T., Hatanaka, M. Expression of the c-myc Gene in Human Gastrointestinal Malignancies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146, 699-704 (1987).

Unger, T., Nau, M.M., Segal, S., and Minna, J.D. A Transdominant Regulator of Transcription whose Function is Abalated by Mutations Occurring in Human Cancer. *EMBO J.* 11, 1383-1390 (1992).

Van der Berg, F.M., Tigges, A.J., Schipper, M.E., den Hartog-Jager, F.C., Kroes W.G., Walboomers, J.M. Expression of the Nuclear Oncogene p53 in Colon Tumours. *J. Pathol.* 157, 193-199 (1989).

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R. Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M.M., and Bos, J.L. Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *The New England Journal of Medicine* 319, 525-532 (1988).

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., and White, R. Allelotype of Colorectal Carcinomas. *Science* 244, 207-211 (1989).

Vousden, K. Interactions of Human Papillomavirus Transforming Proteins with the Product of Tumor Suppressor Genes. *FASEB J.* 7, 872-879 (1993).

Weisz, A., and Rosales, R. Identification of an Estrogen Response Element Upstream of the Human c-fos Gene that Binds the Estrogen Receptor and the AP-1 Transcription Factor. *Mol Endo* 2, 816-824 (1990).

Winaver, S.J. Enker, W.E., and Lightdale C.J. Malign Tumors of Colon and Rectum. *Surgical Clinics of North America* 73 85-101 (1993).

Yamaguchi, A., Fushida, S., Kurosaka, Y., Kanno, M., Yonemura, Y., Miyazaki, I. Immunohistochemical Detection of p53 in Colorectal Cancer and its Relationship to Prognosis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 93, 1312-1316 (1992).

Yamaguchi, A., Kurosaka, Y., Fushida, S., Kanno, M., Yonemura, Y., Miwa, K., Miyazaki, I. Expression of p53 Protein in Colorectal Cancer and its Relationship to Short-Term Prognosis. *Cancer* 70, 2778-2784 (1992).

Yokota, J., Tsunetsugu-Yokota, Y., Battifora, H., Fevre, C.L., and Cline, M.J. Alteration of *myc*, *myb*, and *Ha-ras* Proto-oncogenes in Cancers are Frequent and Show Clinical Correlation. *Science* 231, 261-265 (1986).

Zambetti, G.P., and Levine, A.J. A Comparison of the Biological Activity of Wild-Type and Mutant p53. *FASEB J.* 7, 855-865 (1993).