

51



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2EJ

FACULTAD DE QUIMICA

ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE DNA DE
TUMORES PROVENIENTES DE PACIENTES
CON CANCER COLORRECTAL



T E S EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA **S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

JULIA JEANETT SEGURA URIBE



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

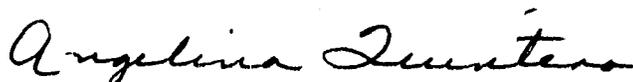
Jurado asignado

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruíz
Vocal: Prof. Beatriz Albina Medina Jiménez
Secretario: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
1er. Suplente: Prof. Marisol López López
2do. Suplente: Prof. Leda Carolina Torres Maldonado

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Cáncer. Departamento de Biología. Facultad de Química. U. N. A. M.
Archivo del Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional, S. XXI., I. M. S. S.

Asesor del tema:



Dra. Angelina Quintero Ruíz

Sustentante:



Julia Jeanett Segura Uribe

A Dios, porque le debo todo.

**A Salvador, mi vida; porque sé que algún día volveremos a estar juntos.
Te amo para siempre...**

**"Ponme como un sello sobre tu corazón, como una marca sobre tu brazo;
porque fuerte es como la muerte el amor..."**

Cantares 8 : 6

A mis papás, Julia y Santiago les dedico este trabajo y les agradezco, aparte de haberme dado la vida, todo su apoyo de siempre, su confianza y su amor, ya que gracias a ustedes he podido seguido adelante. Es un orgullo para mí tenerlos a mi lado. Los adoro!!!

A mis pildoritas amadas David, Santiago y Arturo, quienes con su inocencia, sus risas y sus travesuras me motivan a continuar día a día. Ojalá este trabajo algún día les sirva.

A mi abuelita Felcitas por ser mi amiga, mi confidente, mi consentidora y sencillamente por seguir a mi lado dándome tanto de todo lo que sabe dar.

A mis hermanos Santiago y Gina, por compartir conmigo tantas cosas; y por lo que todavía nos falta por compartir...

A Diego, Marco y Veros y a todos mis tíos, tías, primas y primos por su apoyo y sus ánimos. Me demostraron lo que es tener una familia tan valiosa. Los quiero mucho.

A mis superamiguísimos del alma Antonio Calderón, Laura Pedrero y Juan Ramón Sánchez, gracias por siempre compartir conmigo dichas y desdichas, ser encontrados cuando buscados y por mi pastel de tres pisos; su amistad es valiosísima para mí.

Muy especialmente gracias a Vero Rivera por mostrarme el camino que yo buscaba, además de brindarme su invaluable amistad.

A Vero Ortiz y Juan Carlos Zárraga, por ser mis amigos de siempre, por compartir toda una carrera universitaria y más...

A mis queridos I Q's ' 84, Riggins (Carlos), Cóndor (Lalo), Capu (Javier), Bestia (Marco), Mango (Gustavo), Toño, por esos inolvidables momentos de estacionamiento entre semana, las patadas voladoras de la quemas y sobre todo por ser finísimas y elegantísimas personas.

A mis amigas del laboratorio, Emma y Luz Elena por sus recetas de cocina y sus flanes y pasteles deliciosos que hicieron de los seminarios un deleite.

A los Q' 87 Chucho, Peter Pan (Pedro), Miguelón, Clarck Kent (José Luis), Gerardo, Lalo Robelo, Lalo Lobo, Tere, Horacio, Juan Carlos y a todos los que me dieron la oportunidad de convivir con ellos, gracias por ser tan buena onda.

Muy especialmente a Normis Ortega, las greñudas Mónica y Maricela, Julio César A., Toño C., Ernesto C. y Gustavo Ávila (mi pagrino degeneración), por ser más que simples compañeros a lo largo de este tiempo.

A los Q's 89, Paty G., Xóchitl, Estrella, Bernardo, Paty Pon, Claudia J., los Jose Luises (Cruz Mendiola y García Díaz), Horacio "el güero", Margarita, Monserrata, Lupita, Rubén, Hugo, José Antonio, Lalo, Gaby, Roxanna, por soportar convivir conmigo en algún momento de nuestra carrera.

A los excelentes maestros de toda la Facultad, quienes gracias a su dedicación y esfuerzo, logran formar hombres y mujeres profesionistas valiosos para la sociedad y para el desarrollo de nuestro país. Su trabajo es impresionante. Muchas Gracias!!!

A la Universidad Nacional Autónoma de México y particularmente con muchísimo cariño a mi querida escuela, la Facultad de Química que por muchos años ha sido mi hogar y el lugar en dónde me he realizado como profesionista.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angelina Quintero por ser un ejemplo de dedicación, tenacidad y cariño a este campo tan inmenso de la investigación científica. Gracias por encausarme, por enseñarme y, sobretodo, gracias por tenerme tanta paciencia.

Al Dr. Pedro Luna, Dr. Héctor Santiago Payán, Dra. Isabel Alvarado y a todos los anatómo-patólogos colaboradores del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional S. XXI por su invaluable ayuda al proporcionar el material biológico.

A Carlos Acosta, gracias por la ayuda en todos los trabajos visuales, de impresión y de fotografía que se requirieron para este trabajo.

A Juan Ramón, gracias por la ayuda en las impresiones láser.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	pág 1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
CÁNCER COLORRECTAL	4
EPIDEMIOLOGÍA	5
ETIOLOGÍA	7
CONSUMO DE GRASAS	8
CONSUMO DE COLESTEROL	9
OBESIDAD	9
CALORÍAS Y CARBOHIDRATOS	10
CONSUMO DE ALCOHOL	10

CONSUMO DE FRUTAS, VERDURAS Y FIBRA NATURAL	10
CALCIO, VITAMINAS Y MICRONUTRIMENTOS	11
MODELO DE TUMORIGÉNESIS EN CÁNCER COLORRECTAL	13
TIPOS DE CÁNCER COLORRECTAL	17
POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR	17
SÍNDROME DE GARDNER'S	18
CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPOIDEO	18
SÍNDROME DEL ADENOMA PLANO	19
ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER COLORRECTAL	21
ALTERACIONES EN p53	21
ALTERACIONES EN ras	22
ALTERACIONES EN dcc	23
OTRAS ALTERACIONES GENÉTICAS	23
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
REACTIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RECOLECCIÓN DE TEJIDO	27

SOLUCIONES UTILIZADAS	27
PROCEDIMIENTO	30
PREPARACIÓN DEL FENOL	30
EXTRACCIÓN DEL DNA	31
ELECTROFORESIS	34
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	52
APÉNDICE I (ABREVIATURAS)	58

1. INTRODUCCIÓN

La transformación celular se ha asociado con diversos cambios fenotípicos aunque no todas las células transformadas los adquieren. Estos cambios incluyen la inmortalidad, es decir, las células viven infinitamente, un crecimiento independiente de su adhesión, una disminución en los requerimientos de suero para su crecimiento y una pérdida de la inhibición de la proliferación por contacto, lo que da como resultado la formación de focos o colonias de células transformadas en los frascos de cultivo tisular. La adquisición de estas propiedades es muy importante para la progresión de células normales a malignas. Los eventos principales en los procesos de transformación son generalmente genéticos e irreversibles. Así, se piensa que una célula de algún tejido que haya adquirido la capacidad de crecer aceleradamente como resultado de mutaciones somáticas sucesivas y/o rearrreglos genéticos, adquiere una ventaja proliferativa sobre las demás células que la rodean. Finalmente, el tumor que surge rebasa al tejido hospedero y, en algunos casos se vuelve invasivo y metastásico.⁴²

El cáncer colorrectal humano es un padecimiento que actualmente se ha visto muy incrementado debido a diferentes causas, entre las que destacan principalmente los factores genéticos y los factores ambientales como puede ser el tipo de dieta. Existen tres tipos de cáncer colorrectal que se han estudiado principalmente, que son: el cáncer que desencadena la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP), el Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipoideo (HNPCC) y el cáncer colorrectal esporádico. La aplicación de las técnicas de

biología molecular al DNA obtenido de diferentes tumores colorrectales, permitirá comprender con más claridad el proceso de la tumorigénesis colorrectal, además de conocer el tipo de alteraciones presentes en el tejido tumoral de una población en México.

Un banco o colección de material genético es un conjunto de muestras, ya sea DNA o RNA, de un grupo determinado de miembros de una población particular. Este tipo de bancos son de gran utilidad para el bioquímico o el biólogo molecular, ya que a partir de esta colección es posible realizar diversos tipos de estudios moleculares. De ésta manera se puede trabajar con diferentes genes aprovechando al máximo la ventaja de tener al alcance un banco de material genético ya establecido.

Además del material genético recopilado, también es de gran ayuda contar con un registro de datos fenotípicos de los individuos de los cuales se han obtenido muestras genéticas, ya que muchas veces, sino la mayoría, existe una estrecha relación entre las características genéticas y las morfológicas o fenotípicas. Es por esto que en diversos trabajos se recopilan datos clínicos o morfológicos de los individuos estudiados.

El presente trabajo es la primera fase de un proyecto para estudiar a nivel molecular las alteraciones en el DNA de un grupo de tumores colorrectales de una población en México. Este trabajo consistirá en el establecimiento de un banco de DNA, así como la recopilación de los datos clínicos de pacientes con diferentes tipos de cáncer colorrectal.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Establecer un banco de DNA de tumores provenientes de pacientes mexicanos con cáncer colorrectal.

Objetivos particulares:

- 1) Obtener el DNA del tejido tumoral y normal de un grupo de pacientes mexicanos con cáncer colorrectal.**
- 2) Realizar la recopilación, en el Archivo de Expedientes del Hospital de Oncología del CMN, S. XXI, de los datos clínicos de los pacientes cuyos tejidos han sido recolectados.**

3. ANTECEDENTES

Existen evidencias de que las enfermedades neoplásicas han afectado a la población humana desde los tiempos prehistóricos. Se han descubierto depósitos metastásicos en los esqueletos de momias del Perú de 2400 años, así como en momias egipcias del 3000 a.C. Fue Hipócrates (460-370 a.C.) el primero en proponer una estructura teórica para explicar la invasividad del cáncer: una enfermedad de la bilis negra, uno de los cuatro "humores" corporales (bilis negra, bilis amarilla, sangre y flema). Se creía que la invasión ocurría cuando la bilis negra se difundía dentro o fuera del tejido afectado. Esta teoría prevaleció por mas de 2000 años.

El primero que describió la etiología celular del cáncer fue Johannes Peter Mueller en 1828. Al año siguiente, Joseph Claude Recamier propuso que la invasividad y la extensión hacia otros tejidos son el resultado de la translocación de células, utilizando el término "metástasis" para describir este proceso.

Durante el siglo y medio pasado la investigación en el área ha revelado que los factores celulares y "humorales" sí se ven involucrados en la patogénesis del cáncer colorrectal.⁶

CÁNCER COLORRECTAL

Debido al extenso desarrollo de la investigación durante la última década, se ha logrado un avance significativo de nuestro entendimiento acerca de los

mecanismos de la carcinogénesis. El carcinoma colorrectal es un modelo único entre los modelos del desarrollo del cáncer, ya que la progresión del estado de premalignidad al de malignidad está muy bien documentado. Existe una secuencia pólipo-cáncer que ocurre en la superficie epitelial, la cual se encuentra al alcance de los endoscopistas para su estudio. Esta accesibilidad ha capacitado a los investigadores para documentar los cambios alelotípicos progresivos, como la evolución de clonas de células anormales hasta un fenotipo completamente tumorigénico. Como resultado, el cáncer colorrectal se considera uno de los ejemplos mejor documentados de la progresión genética en multietapas de la transformación maligna.

Estas observaciones han promovido la evolución de la teoría oncogénica, que sugiere que el desarrollo del cáncer es el resultado de una expresión o función anormal de los genes. Esta anomalía genética puede resultar de la desrepresión de genes, tal vez como resultado de alguna inserción de señales provirales; de mutaciones puntuales causadas por carcinógenos; o de alguna pérdida genética a través de una translocación anormal. Las mutaciones puntuales específicas en alguna región de la doble hélice del DNA pudieran proveer "moldes" para la síntesis de proteínas citoplasmáticas o de superficie, alteradas pero funcionalmente activas, que escapen de algún tipo de control o regulación. A los genes involucrados se les denomina "oncogenes", mientras que a los genes no mutados o precursores reprimidos de los anteriores se les llama "proto-oncogenes". A los genes de regulación negativa algunas veces se les llama "antioncogenes" o "genes supresores tumorales". Todos estos genes están involucrados en la regulación de algunos aspectos de la proliferación celular.

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer del intestino grueso es, con excepción de los tumores malignos de pulmón, una de las primeras causas de muerte por cáncer en países desarrollados, como en los Estados Unidos.¹² La frecuencia de esta enfermedad a nivel mundial al parecer se relaciona con el alto índice de industrialización y de los niveles socio-económicos elevados.

Existe una alta incidencia de cáncer colorrectal en los países desarrollados, incluyendo Europa Occidental, Escandinavia, Canadá y Nueva Zelanda (Fig.

3.1). Una incidencia intermedia se observa en Europa Oriental, mientras que en África del Sur, Asia y Sudamérica, con la excepción de Uruguay y Argentina, existe una baja incidencia de esta enfermedad. Durante las tres décadas posteriores a 1945, se ha visto un incremento notable en el índice de muertes por cáncer colorrectal en Italia, Chile y Japón, tanto en hombres como en mujeres.¹²

En países como los Estados Unidos, Nueva Zelanda y Singapur se han registrado amplias variaciones en diferentes razas con respecto a la incidencia de cáncer colorrectal. La población blanca de los Estados Unidos presenta una mayor incidencia que los indios americanos o los hispanos. Los polinesios de Nueva Zelanda y Hawaii presentan menores índices que las poblaciones caucásicas de estas regiones, mientras que en Singapur, las poblaciones de hindúes y malayos muestran menores índices que los chinos.²²

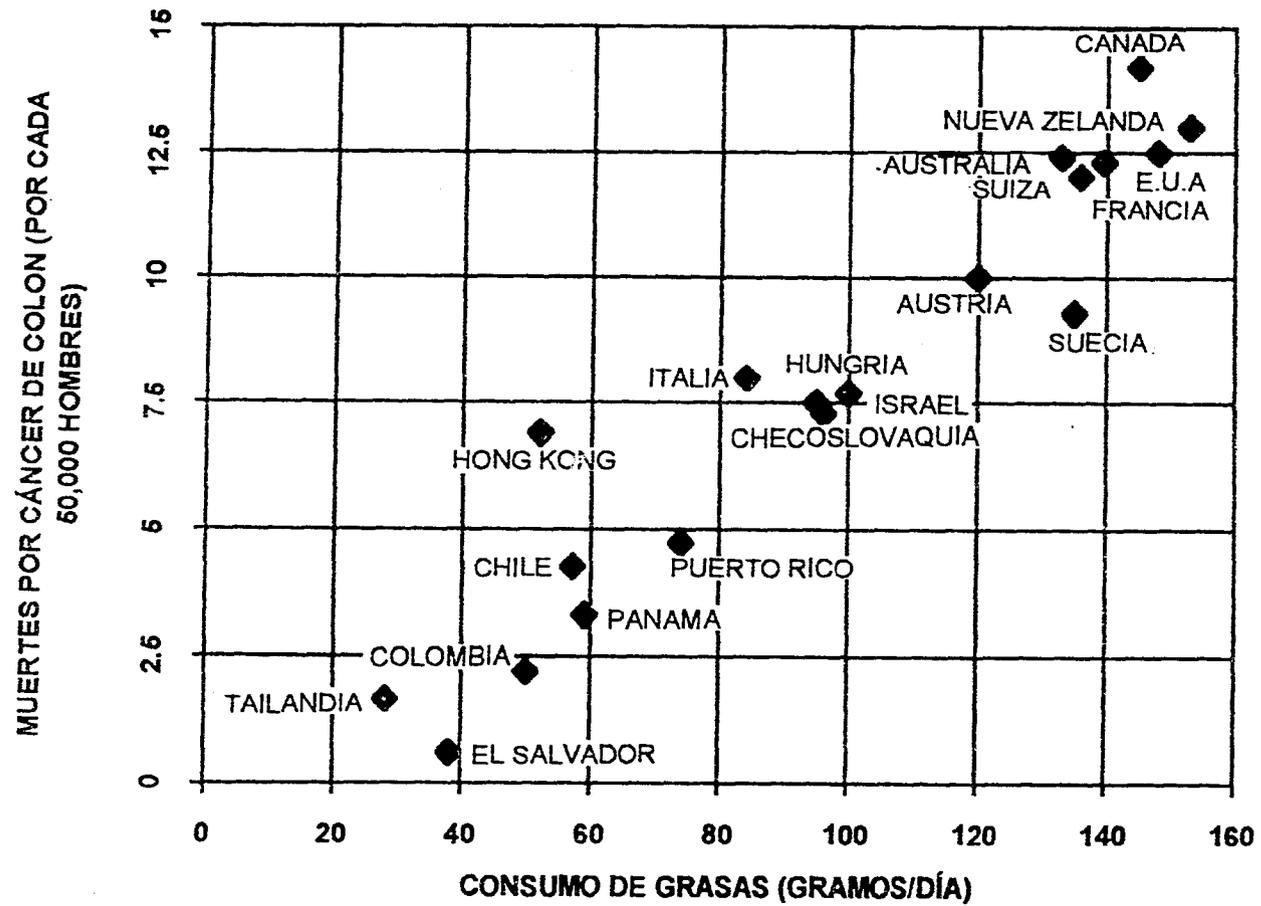
Este padecimiento ha aumentado en los países en vías de desarrollo debido al incremento del índice de industrialización, coincidente con el desarrollo económico y la adopción de dietas similares a las de otros países industrializados. Un ejemplo que ilustra a este tipo de países es Japón, que con su rápido desarrollo e industrialización, muestra evidencia definitiva de la estrecha relación entre la frecuencia de cáncer colorrectal y el nivel socio-económico del país.^{6, 43}

Existen estudios epidemiológicos donde se demuestra que los hábitos dietéticos, así como cierto tipo de sustancias químicas que se ingieren, pueden influir en el desarrollo de pólipos, adenomas y carcinomas colorrectales. Estos estudios han formado las bases de la influencia de los factores dietéticos en el desarrollo de cáncer colorrectal.⁶

Entre los factores dietéticos que se correlacionan más fuertemente con un alto riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal se encuentran el consumo de grasas, especialmente grasas animales, ingesta de carnes, carbohidratos refinados y el alto contenido de colesterol, ya que se ha encontrado en heces fecales.^{4,6,8,43,44}

La incidencia de cáncer colorrectal es mayor en los países industrializados donde el consumo *per capita* de estos factores (carnes, grasas y carbohidratos refinados) es muy alto.

Fig. 1. Relación de muertes por cáncer colorrectal en hombres vs. consumo de grasas por día en 19 países (Statland, 1994).



La amplia variación en la distribución geográfica del carcinoma colorrectal, está implicada en la etiología de este padecimiento. En general, el cáncer colorrectal se ha caracterizado como un padecimiento de personas de edad avanzada ya que la gran mayoría de los pacientes son mayores de 60 años. Sin embargo, se debe considerar que el 8% de los casos ocurren antes de los 40 años y que en la literatura se han reportado casos de carcinoma colorrectal en pacientes menores de 20 años.¹²

La incidencia global de esta enfermedad se distribuye muy similarmente entre los dos sexos. Sin embargo, parece ser que existe un ligero predominio de tumores de colon en mujeres con una relación de 1.2:1, mientras que para el cáncer rectal, el predominio es de los varones con una relación de 1.4:1.

Es interesante el hecho de que en algunos países como China, con una incidencia de baja a moderada de cáncer colorrectal, prevalecen las lesiones del colon derecho sobre las de colon izquierdo, además de que la población afectada es más joven. De estos factores, uno podría esperar algunas diferencias en las características clínicas y los rasgos patológicos así como en el comportamiento biológico del cáncer colorrectal entre los diferentes países con alta incidencia, y aquellos con baja incidencia del padecimiento.

Es de hacerse notar como un fenómeno curioso, que varios reportes sobre el sitio de distribución del cáncer colorrectal en los Estados Unidos, muestran que el cáncer colorrectal se presenta comunmente en el colon proximal, es decir, en el ciego y el colon ascendente y en su mayor parte en pacientes de edad avanzada.¹²

ETIOLOGÍA

La patogénesis del cáncer colorrectal debe considerarse como una compleja interacción entre el perfil genético del individuo y el medio ambiente que lo rodea.⁶

Comparando los diferentes porcentajes de cáncer entre ciertas áreas geográficas, entre grupos de migrantes y grupos religiosos, se ha obtenido evidencia indirecta de que las dietas altas en grasas y bajas en vegetales y otras fuentes de fibra, son factores de riesgo de cáncer colorrectal.⁷

CONSUMO DE GRASAS

De todos los factores dietéticos que se cree que implican riesgo para desarrollar cáncer, el que ha llamado más la atención de los investigadores es el consumo de grasas. Observaciones sugieren que la composición de ácidos grasos puede ser relevante y el riesgo aumenta con un exceso en el consumo de grasas saturadas .

Los estudios epidemiológicos no proporcionan evidencia inequívoca de que el consumo de grasa desempeñe un papel causal en la etiología del cáncer colorrectal; sin embargo se han hecho estudios que respaldan fuertemente la hipótesis de que este tipo de dieta alta en grasas es importante.

En un estudio de caso-control realizado en el oeste de Nueva York, el riesgo aumentaba con el incremento del consumo de grasa y de kilocalorías, con el riesgo de la grasa persistente en los hombres, aún después de ajustar el consumo de kilocalorías.

En otro estudio realizado con hombres profesionistas sanos, se encontró que la ingesta de grasas saturadas era asociada positivamente al riesgo para el desarrollo de adenomas colorrectales; y en un estudio de caso-control realizado en Grecia, se encontró que se incrementaba el riesgo entre las personas que consumían altas cantidades de grasa en su dieta y tenían bajas cantidades de colesterol en el suero.

Sin embargo, en otro estudio de caso-control realizado en poblaciones mediterráneas sobre cáncer colorrectal no se encontró efecto por las grasas, pero sí por las calorías totales y por el colesterol de la dieta. En Estocolmo se realizó otro estudio caso-control y se encontró un riesgo aumentado en personas que consumían grandes cantidades de carne asada al carbón o quemada.⁶

El alto consumo de grasas conlleva a una mayor excreción de ácidos biliares, y en modelos animales, se ha visto que los ácidos biliares actúan como promotores tumorales en el colon.⁶ Existe una hipótesis que predice que una mayor excreción de ácidos biliares altera la población bacteriana del intestino grueso. Con dietas bajas en el contenido de grasas la población bacteriana es principalmente aerobia y esta no transforma los ácidos biliares primarios a ácidos biliares secundarios. En cambio, en dietas con alto contenido de grasas, la flora bacteriana se transforma a anaeróbica y los ácidos biliares primarios se convierten a secundarios, como son el desoxicolato y litocolato. Los ácidos

biliares secundarios son los que actúan propiamente como promotores de las lesiones del intestino grueso.⁴³

Existen otros compuestos, llamados fecapentaenos que son un grupo de lípidos insaturados enlazados a éteres, que se han encontrado en heces fecales de personas que consumen altas cantidades de grasas y baja fibra en la dieta. Se ha demostrado que son poderosos mutágenos en diversos sistemas in vitro. Se cree que si los fecapentaenos juegan algún papel en el desarrollo del cáncer colorrectal, su participación más bien se relaciona a la transformación de adenoma a carcinoma más que a la iniciación tumoral, aunque esto no ha sido del todo comprobado.¹⁷

CONSUMO DE COLESTEROL

Algunos de los estudios más recientes realizados en cáncer de mama y colon, mostraron que el consumo de colesterol en la dieta es un factor de alto riesgo, aunque éste era sustancialmente menor que el producido por el consumo de grasas totales y/o saturadas, y por eso no se le ha dado mayor importancia por bastante tiempo.⁹

OBESIDAD

Se han realizado estudios que sugieren que la obesidad incrementa el riesgo de cáncer de colon. Hombres que pesan 40% más de su peso promedio tienen un 35% más de probabilidad de morir de cáncer, especialmente de colon y recto. En un estudio de 52,539 hombres en Hawaii, se observó que la obesidad en la juventud y en la madurez, incrementaba el riesgo de cáncer en la porción sigmoide del colon. Sin embargo, en otro estudio en Estados Unidos no se encontró una relación directa entre la masa corporal y el riesgo de contraer cáncer colorrectal.

Para el caso de las mujeres que pesan arriba del 40% de su peso promedio, tienen un 160% más de probable mortandad por cáncer. Las mujeres que son obesas tienden a padecer cáncer de vejiga, mama, cérvix, endometrio y ovario principalmente. Los individuos obesos poseen concentraciones elevadas de prolactina, andrógenos, estrógenos y cortisol. El tejido adiposo es el lugar donde existe una mayor formación de estrógenos en mujeres postmenopáusicas. Se ha pensado que el estrógeno actúa como promotor de varios tumores. ^{8, 43}

CALORÍAS Y CARBOHIDRATOS

Algunos estudios han proporcionado evidencia de un efecto positivo de los azúcares en el incremento del riesgo de cáncer colorrectal; por ejemplo en un estudio realizado en Utah, otro en Los Angeles y otro en Bélgica, se encontró que los oligosacáridos eran factor de riesgo. En estudios realizados con modelos animales, se ha visto que una de las formas más efectivas de disminuir la incidencia de cualquier tipo de cáncer, es la restricción calórica, por lo que se cree que existe un mecanismo similar para cierto tipo de cáncer humano.⁸

CONSUMO DE ALCOHOL

En general, de todos los factores que se ha mostrado que producen riesgo de cáncer, el que presenta la evidencia más fuerte de su acción es el alcohol.

El consumo de alcohol se relaciona causalmente al cáncer primario de hígado, aunque para el riesgo de cáncer de colon, recto y de pecho, el papel del alcohol no se conoce con claridad.

El cáncer colorrectal se ha asociado a la ingesta de alcohol, especialmente al consumo de cerveza en cáncer de recto. En un análisis de 27 estudios realizados se muestra una débil asociación entre el alcohol y el cáncer colorrectal, siendo ésta mayor con la cerveza que con otro tipo de bebidas alcohólicas. El análisis de dos estudios realizados en Marsella, Francia, uno en cáncer colorrectal y uno en poliposis adenomatosa de colon y recto, se mostró un elevado riesgo para cáncer de recto, pero no para cáncer de colon o pólipos, en hombres bebedores de cerveza. En un estudio de caso-control realizado en Los Angeles, se encontró que la ingestión de alcohol tiene una contribución significativa al efecto de las calorías como fuente de incremento de los riesgos.⁸

CONSUMO DE FRUTAS, VERDURAS Y FIBRA NATURAL

Algunos constituyentes dietéticos pueden aportar protección en contra del desarrollo de carcinoma colorrectal. Existen hipótesis en las que se cree que la deficiencia en el consumo de fibra en los países industrializados, aumenta los riesgos para el cáncer colorrectal.^{6,7,8}

El consumo de fibra de frutas y verduras más que de cereales y granos se ha asociado a una reducción del riesgo para el cáncer colorrectal.⁶

En un estudio de cáncer de recto en el oeste de Nueva York, se observó que había un efecto de protección de la fibra proveniente de vegetales, pero no de la que provenía de granos o de los demás alimentos que la contienen.⁸

Los vegetales como coliflor, brócoli, coles de Bruselas, nabos, etc., contienen compuestos derivados del indol que pueden tener propiedades antitumorales. Estos estudios apoyan la hipótesis de que el consumo de vegetales durante toda la vida, reduce el riesgo de contraer cáncer colorrectal.⁷

CALCIO, VITAMINAS Y MICRONUTRIMENTOS

En pacientes con alto riesgo de contraer cáncer, un suplemento de calcio en la dieta puede disminuir el riesgo de formación de pólipos y carcinomas. Lipkin y Newman demostraron convincentemente que un suplemento de calcio (1250 mg/día) en la dieta diaria reduce las probabilidades de la proliferación de pólipos en pacientes de alto riesgo por cáncer familiar.

También el consumo de ciertas vitaminas (A, C, D y E) y de micronutrientes como el selenio, sulfuro de dialilo y alil metil trisulfuro (ambos contenidos en el ajo), se asocia a una disminución en el riesgo de la formación de cáncer colorrectal (Tabla 3.1).^{6,8,9, 45}

Tabla 3.1. Propiedades Benéficas de ciertos micronutrientes en la posible disminución del riesgo de cáncer colorrectal. (Millsom, 1993)

Micronutriente	Mecanismo de acción
Calcio	Aumenta la adhesión celular; disminuye la proliferación celular
Vitamina D	Retarda el crecimiento de células cancerígenas humanas <i>in vitro</i> ; baja los niveles de ornitina descarboxilasa en ratas
Vitamina A	La administración puede suprimir tumores experimentales de colon
Vitamina C	Previene la formación de compuestos N-nitroso por sus propiedades antioxidantes; disminuye el desarrollo tumoral después de la administración de carcinógenos
Vitamina E	Atrapa radicales libres que inhiben y promueven el crecimiento tumoral en los modelos de carcinogénesis
Selenio	Es cofactor del anticarcinógeno glutatión peroxidasa
Sulfuro de dialilo (compuesto del ajo)	Inhibe el daño nuclear inducido por carcinógenos
Alil metil trisulfuro (compuesto del ajo)	Aumenta la actividad de la glutatión-S-transferasa, que puede ser que inactive carcinógenos.

MODELO DE TUMORIGÉNESIS EN CÁNCER COLORRECTAL

Pocos temas en la investigación del cáncer han causado tanto interés como el descubrimiento de defectos genéticos identificables en pacientes con cáncer colorrectal tanto hereditario como esporádico. Así, la mayor parte de la investigación actualmente se enfoca en el estudio de los mecanismos moleculares y genéticos de la tumorigénesis.⁸

Desde hace tiempo se piensa que el proceso de formación de un tumor (tumorigénesis), se lleva a cabo en varias etapas. Sin embargo no había sido posible sino hasta ahora, identificar los eventos moleculares que se llevan a cabo en la iniciación y la progresión tumoral humana.

Se ha sugerido a partir de una gran cantidad de datos clínicos e histopatológicos, que los tumores colorrectales malignos (carcinomas) provienen de tumores benignos preexistentes (adenomas). También contribuyen de manera importante al desarrollo de la neoplasia colorrectal los factores hereditarios y ambientales.³

Se han propuesto varias hipótesis acerca del desarrollo de cáncer. Las teorías mutacionales predicen que las neoplasias tendrán una composición monoclonal.

Para lograr comprender mejor las bases moleculares de la expansión clonal, se buscan métodos para identificar alteraciones somáticas presentes en las diferentes etapas de la formación del tumor colorrectal. La presencia de alteraciones existentes en todas o casi todas las células neoplásicas, sugiere que la alteración genética provee a la célula de la capacidad de multiplicarse, originando más células neoplásicas que van formando un tumor constituido predominantemente de este tipo de células alteradas (expansión clonal).

Estudios sobre la composición clonal de los tumores colorrectales humanos han demostrado que todos los tumores examinados, incluyendo adenomas muy pequeños, tienen una composición monoclonal.³

La carcinogénesis es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas, dirigido por daños genéticos en ciertas células susceptibles que adquieren la capacidad de crecer aceleradamente, expandiéndose como resultado de la activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores

tumorales. Los proto-oncogenes son genes celulares normales que se activan por algún mecanismo que altera su función normal. Estos ocasionan un crecimiento celular desregulado e incrementan la posibilidad de una transformación neoplásica.¹⁶ Los tumores colorrectales surgen como resultado de este tipo de alteraciones que activan oncogenes acopladas a las que inactivan genes de supresión tumoral, siendo estas últimas las alteraciones que predominan.³

El proceso de tumorigénesis en cáncer colorrectal involucra alteraciones genéticas en oncogenes tales como *ras* y en los supresores tumorales, particularmente aquellos en los cromosomas 5q (*apc*), 17p (*p53*) Y 18q (*dcc* y *mcc*).

Para la activación de ciertos oncogenes, por ser genes dominantes, basta con alguna alteración en uno de los alelos, mientras que la pérdida de la función en los supresores tumorales resulta si los dos alelos han sido dañados, ya que estos genes son recesivos generalmente.^{2, 18}

La tumorigénesis es precedida por una amplia propagación de la hiperproliferación celular que se detecta en las células epiteliales de la mucosa del colon. Una o un número pequeño de éstas células hiperproliferativas inician el proceso de la neoplasia por un mecanismo de expansión clonal, formando un adenoma tubular pequeño (pólipo). Los adenomas gradualmente progresan en tamaño, en grado de displasia y adquieren una morfología vellosa, es decir, toman la apariencia de fibrillas.^{3,16}

Generalmente se representan tres estadios en la formación de los adenomas, aunque el proceso en realidad es continuo. Cualquier tipo de adenoma se considera como un tumor benigno; si alguna célula del adenoma adquiere la capacidad de crecer más aceleradamente, de manera que cubra a las demás células del adenoma y además pueda invadir a través de la membrana basal, por definición surge un carcinoma. Los carcinomas progresan paulatinamente adquiriendo la capacidad de formar metástasis hacia nodos linfáticos regionales y/o hacia sitios más distantes, como por ejemplo al hígado. La completa progresión puede ocurrir en varias décadas.¹⁶

Diversas alteraciones genéticas acompañan el proceso y pueden ser responsables de este. En pacientes con FAP (Poliposis Adenomatosa

Familiar), se hereda una mutación en el cromosoma 5q. Se cree que esta alteración puede ser la causante de la hiperproliferación del epitelio presente en estos pacientes. En los tumores que surgen en pacientes sin poliposis, la misma región se ha visto mutada en una etapa relativamente temprana de la tumorigénesis. También se ha observado hipometilación del DNA en adenomas muy pequeños de pacientes con o sin poliposis. Esta alteración puede ser causante de la pérdida de alelos de genes supresores de tumores. Las mutaciones en *ras*, al parecer ocurren en una célula de un pequeño adenoma preexistente y a través de un proceso de expansión clonal, se va produciendo un tumor cada vez más grande y más displásico. Las deleciones ocurren con mayor frecuencia en los cromosomas 5q, 17p y 18q. Las deleciones alélicas de los cromosomas 17p y 18q ocurren en etapas tardías del desarrollo tumoral en relación a las deleciones que ocurren en el cromosoma 5q y/o las mutaciones del gen *c-Ki-ras* (Fig. 3.2). Sin embargo, el orden de estos cambios no es invariable y la acumulación de ellos resulta más importante que el orden en el que ocurren. Una vez que se ha formado el carcinoma, las células tumorales continúan progresando y la acumulación de pérdidas en los alelos de otros cromosomas adicionales se correlaciona con la capacidad del tumor para producir metástasis y causar la muerte.^{3, 16}

En varios estudios realizados, se ha encontrado que de 47-50% de los carcinomas contienen mutaciones puntuales en el gen *ras*, de las cuales la mayoría (88%) son en *c-Ki-ras*. Los adenomas divididos en tres clases, resultaron de la siguiente manera: la clase I presentó el 13% de mutaciones, sin embargo, las clases II y III tuvieron un porcentaje tan frecuente como los carcinomas (50%). El 58% de los adenomas mayores de 1 cm presentaron mutaciones en *c-Ki-ras*, mientras que solo el 9% de los adenomas menores de 1 cm presentaron estas mutaciones.^{3, 5, 16, 20}

Las deleciones del cromosoma 5q se han observado comunmente en pacientes sin poliposis, en 29% de los adenomas clase II y III y en 36% de los carcinomas. Los tumores con alteraciones alélicas del cromosoma 5q, presentaban recombinaciones mitóticas o deleciones que afectaban diferencialmente los marcadores del cromosoma 5q.^{3, 16, 20}

Para el cromosoma 18q, las deleciones alélicas se han encontrado en la mayoría de los carcinomas (73%), además de los adenomas de clase III (47%).

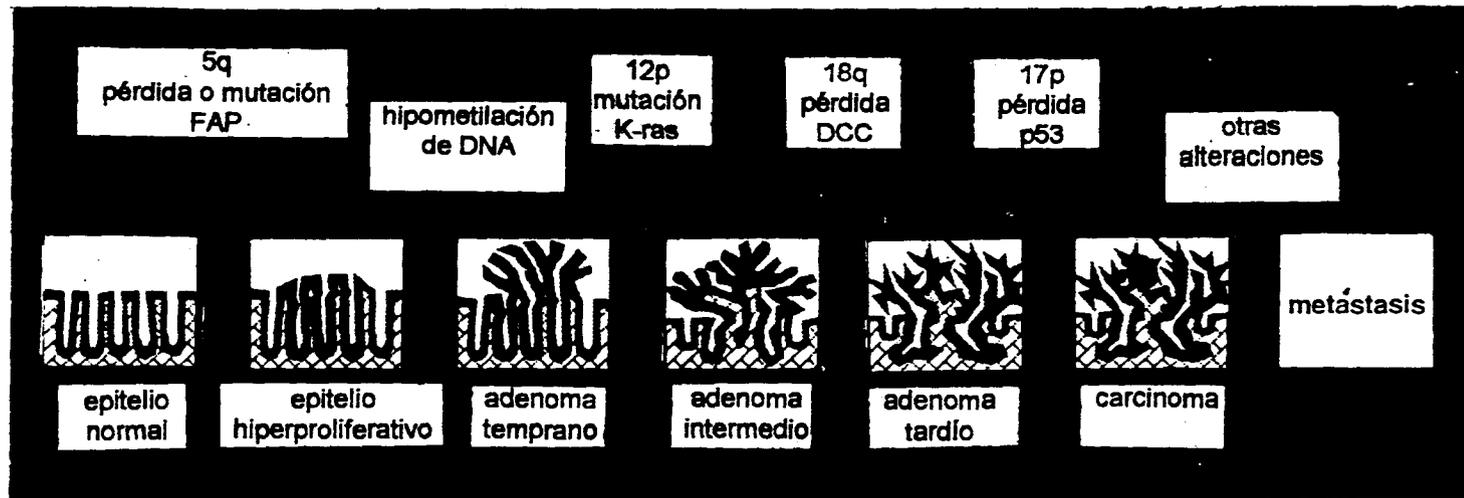


Fig. 2. Modelo de la tumorigénesis colorrectal, en el cual se observan los cambios genéticos que llevan al desarrollo del cáncer colorrectal (Gallick, 1994)

En los adenomas de clase I y II se han observado con menor frecuencia en 13% y 11% respectivamente.^{3, 16, 20, 40}

Las deleciones alélicas del cromosoma 17p se han visto en un 75% de los carcinomas, en los adenomas clase I y II se ha visto un 6% en los dos y en un 24% de los adenomas de clase III.

Las deleciones alélicas de los cromosomas 17p y 18q son poco frecuentes en los adenomas de clase I y II. Sin embargo, las deleciones alélicas del cromosoma 18q ocurren en la mitad de los adenomas de clase III, aunque la frecuencia con la que se pierden las secuencias del cromosoma 17p es relativamente baja aún en estos adenomas más avanzados.^{3, 5, 16, 20}

Las mutaciones del gen *ras* y las deleciones del cromosoma 5q, ocurren generalmente en una etapa temprana de la neoplasia, a diferencia de las deleciones alélicas del cromosoma 18q, que generalmente preceden las deleciones alélicas del cromosoma 17p en etapas más avanzadas de la neoplasia colorrectal.³

Se ha encontrado que las cuatro alteraciones genéticas mencionadas (mutaciones de *ras* y deleciones en los cromosomas 5q, 17p y 18q), ocurren con una frecuencia similar en poblaciones geográficamente y étnicamente diferentes. Se han hecho estudios de las cuatro alteraciones genéticas en tumores colorrectales clasificados en diferentes etapas. Más del 90% de los carcinomas presentaron dos o más alteraciones. En contraste, solo un 7% de los adenomas tempranos mostraron más de una de las cuatro alteraciones, y este porcentaje se incrementó gradualmente al 25% y después al 49% conforme los adenomas progresaban a las etapas intermedia y avanzada, respectivamente. Fue de interés el hecho de que dos de los adenomas avanzados contenían las cuatro alteraciones genéticas mencionadas. Esta observación apoya la idea de que las alteraciones de sólo estos cuatro genes no son suficientes para la progresión maligna del tumor.³

TIPOS DE CANCER COLORRECTAL

Los síndromes hereditarios de cáncer ofrecen la oportunidad de identificar algunos mecanismos genéticos de la carcinogénesis.²⁸

El cáncer de colon ocurre frecuentemente en ciertos núcleos familiares. Los parientes en primer grado de pacientes con cáncer colorrectal tienen un incremento en el riesgo dos o tres veces mayor de cáncer colorrectal que el pariente afectado. Este exceso en el riesgo es secundario a algunos síndromes hereditarios bien definidos. Estos incluyen los padecimientos hereditarios de poliposis, principalmente el síndrome de Gardner's y la poliposis adenomatosa familiar; y las variedades no polipoideas, como el síndrome familiar de cáncer y el cáncer colorrectal hereditario no polipoideo, así como el síndrome del adenoma plano. Estos síndromes juntos son tan solo el 5% de todos los casos de cáncer colorrectal. Los factores familiares son de gran importancia para el diagnóstico y el manejo de los individuos con alto riesgo. Es por esto la importancia de aclarar el síndrome particular o la categoría de riesgo a la que el individuo pertenece.²⁹

POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (FAP)

Existe un síndrome en el cual se hereda la predisposición para la formación del tumor colorrectal, la Poliposis Adenomatosa Familiar, en el que se forman cientos de miles de adenomas (pólipos) en los individuos afectados (Fig. 3.3). Estos síndromes muestran un patrón de herencia autosómico dominante y se caracterizan por aparecer generalmente alrededor de la tercera década de la vida. La PAF se presenta en 1 de cada 5,000 americanos y en 1 de cada 17,000 japoneses. Los individuos afectados generalmente desarrollan de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon y en el recto, de los cuales una fracción pequeña progresará a carcinoma si no son tratados quirúrgicamente. El sitio característico que se ha asociado al FAP es en el cromosoma 5q, ya que en los pacientes que tienen poliposis como en los pacientes sin FAP, se han encontrado deleciones alélicas en este cromosoma. Se piensa que éstas pérdidas indican la presencia de un gen supresor tumoral en la región que ha sufrido la deleción. Los genes que se han asociado a este cromosoma son el *apc* (Adenomatous Polyposis Coli) y el *mcc* (Mutated in Colorectal Cancer).^{1, 3, 30}

SÍNDROME DE GARDNER'S

Otro síndrome descrito relacionado con los pólipos colónicos es el síndrome de Gardner's que se distingue por un número de adenomas extracolónicos. Este síndrome también incluye múltiples osteomas particularmente de la mandíbula y cráneo, quistes epidérmicos e hipertrofia congénita del epitelio del pigmento retinal. Estos síndromes se caracterizan por ser autosómicos dominantes, y por la aparición de cientos de pólipos en el colon, frecuentemente en la tercera década de la vida (Fig 3.3).^{28,32}

CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPOIDEO (HNPCC)

El cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC) es común y comprende un 4-6% del total de los cánceres colorrectales. Se ha reconocido en diferentes familias.²³

Es heterogéneo y se puede clasificar en dos subclases clínicas, el síndrome Lynch I y el Lynch II. El síndrome Lynch I se caracteriza por una propensión hereditaria autosomal dominante a una temprana aparición de cáncer de colon (alrededor de los 44 años) con predominancia proximal a la curva esplénica (aproximadamente un 70%) y un exceso de múltiples tumores primarios, en ausencia de polipos difusos. El síndrome Lynch II posee estas mismas características además de otros sitios extracolónicos en los que se desarrolla el cáncer, de los cuales el más común es el carcinoma de endometrio, aunque también se puede presentar en estómago, laringe, aparato génito-urinario, ovario, páncreas, intestino delgado y ducto biliar. Se ha identificado que en general los tumores hereditarios son pobremente diferenciados (24%) y mucinosos (39%).²⁴

Se ha sugerido a partir de trabajos recientes, que existe un gen asociado a este padecimiento, aunque los estudios realizados indican que falta profundizar en estas investigaciones. Este gen se denomina *hms2* (human mutS homologue 2), y se localiza en el cromosoma 2p22-21. Se cree que el producto de este gen interviene en los procesos de reparación de apareamientos defectuosos o múltiples repeticiones de nucleótidos en el mecanismo de replicación del DNA (RER).²⁷ La hipótesis de que la mutación del gen *hms2* es responsable del HNPCC, se apoya con las mutaciones de T a C que se han visto en la posición -6 del aceptor de empalme del intrón localizado en el

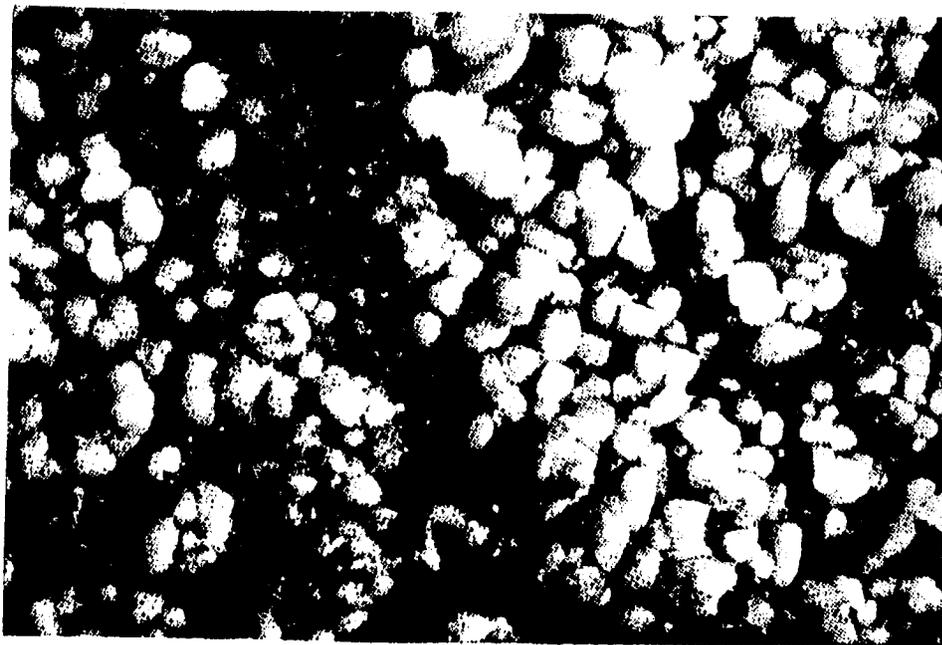


Fig. 3. Cientos de pólipos se presentan en el síndrome de Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP).



Fig. 4. Tumores colorrectales con mucosa aparentemente normal adyacente. Este tipo de tumores se presentan frecuentemente en pacientes con cáncer colorrectal esporádico.

nucleótido 2020 de la secuencia del cDNA.²⁵ Este locus también ha sido asociado a otro síndrome hereditario denominado síndrome de Muir-Torre, en el cual se presentan tumores en glándulas sebáceas, asociados a otro tipo de tumores, que pueden ser colorrectales, de endometrio o de piel, particularmente queratoacantomas y tumores de células basales.²⁶

SÍNDROME DEL ADENOMA PLANO

Los estudios realizados para identificar familias con HNPCC permitieron el reconocimiento de una familia con múltiples pólipos (2-100) generalmente del lado derecho del colon y que presentaban las características macroscópicas y microscópicas descritas anteriormente por Muto, et al, de los adenomas planos. Los adenomas planos presentan bordes levantados con depresiones frecuentes en el centro. Microscópicamente, estas lesiones son adenomas tubulares en los que la progresión del tumor se concentra cerca de la superficie luminal de la mucosa. Los adenomas planos tienen un predominio del lado derecho y a una edad relativamente avanzada surge el implante de cáncer colorrectal. Estas características podrían reflejar un proceso clínicamente intermedio entre HNPCC y FAP. La expresión de pólipos es diferente a FAP en términos del número y la distribución anatómica de éstos; esto es, los pacientes afectados desarrollan docenas de pólipos, pero muy rara vez llegan a ser 100 y nunca llegan a ser miles, como es la característica del FAP.⁵⁰

TABLA 3.2. Diferencias principales entre los diversos síndromes hereditarios de cáncer colorrectal (Lynch, et. al, 1991)

	Edad	Nº de pólipos	Macroscópico	Localización de los pólipos	Localización general del tumor primario	Otros tumores
FAP	Temprana	>100	Típico	Lado izquierdo o total	Lado izquierdo o total	Gastrointestinales ampulares
HNPCC	Temprana	<10	Típico o ausente	Lado derecho generalmente	Lado derecho	Endometrio, estómago, páncreas, laringe, ducto biliar
Síndrome del adenoma plano	Avanzada	0-100	Adenoma plano	Lado derecho generalmente	Lado derecho	Periampulares, hepatoblastoma de significado desconocido
Esporádico	Avanzada	0	Indistinto	No hay pólipos	Indistinto	Otros, puede haber o no

ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER COLORRECTAL

ALTERACIONES EN p53

Se ha visto la pérdida de una gran porción del cromosoma 17p en más del 75% de los carcinomas colorrectales, mientras que ésta pérdida es relativamente poco frecuente en adenomas en cualquier etapa; en varios pacientes las pérdidas del 17p se han asociado a la progresión individual del tumor, de adenoma a carcinoma.¹⁸

La región que comúnmente se pierde del cromosoma 17p ya se ha identificado y ésta contiene al gen que codifica para p53.

El producto codificado por p53, la fosfoproteína nuclear p53, participa en la activación de la replicación y la transcripción de DNA; también participa en la reparación del DNA cuando éste se encuentra dañado. La evidencia acumulada sugiere que el gen p53 silvestre o no mutado funciona como supresor tumoral.

Las células normales aumentan la producción de p53 y detienen al ciclo celular en la fase 'G1', antes de entrar en la fase 'S', para reparar cualquier daño que pudiera existir en el DNA. Si el daño es irreparable, se cree que las células mueren por el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis; las células con daño reparable entran a la fase 'S' y después de llevar a cabo la replicación del DNA, se lleva a cabo la división celular. Por otro lado, las células premalignas con mutaciones en p53 o ausencia de la proteína p53 conservan el daño genético a través de la división celular, lo que puede culminar en algún tipo de cáncer invasivo.

Se ha observado en diversos tumores las mismas pérdidas del cromosoma 17p; las mutaciones que resultan por sustituciones de aminoácidos en el producto del gen p53, se conservan en los alelos del mismo gen. Entonces, esta alteración que consiste en las mutaciones puntuales de uno de los alelos del gen p53 aunadas a la pérdida o deleción del otro alelo no mutado, es lo que se ve que ocurre frecuentemente en los carcinomas colorrectales entre otros carcinomas.^{2, 6}

El producto de p53 mutado puede inactivar al producto del alelo nativo uniéndose a este, ya que, al oligomerizarse, forma un dímero que le impide su asociación normal con otros constituyentes celulares. En base a esto, parece entonces que un gen p53 mutado provee a la célula de la capacidad de crecer aceleradamente, aún en presencia del alelo nativo. Esta hipótesis apoya la

idea de que los carcinomas colorrectales con deleciones de los alelos de p53 son más agresivos que los que no tienen estas deleciones.³

ALTERACIONES EN RAS

Otro gen involucrado en el proceso del desarrollo del cáncer colorrectal es el oncogen *ras*. Esta familia de genes y sus productos estan entre los oncogenes celulares mejor estudiados a la fecha. Los genes *ras* se encontraron inicialmente en el genoma de ciertos virus de sarcomas animales, los virus de Harvey y Kirsten.⁵¹

Los genes *ras* de mamíferos, son genes estructurales que codifican para proteínas (p21) que exhiben actividad hidrolítica y de enlace a nucleótidos de guanina, además de estar unidas a la superficie interna de la membrana citoplasmática por una región lipídica de esta, através de su extremo carboxilo terminal. Este gen codifica para proteínas homólogas a las proteínas G, ya que también regulan la transducción de señales por un mecanismo similar. Hasta la fecha se han caracterizado tres oncogenes humanos de la familia *ras*, c-Ha-*ras*, c-Ki-*ras* y c-N-*ras*. La activación del oncogen *ras* ocurre aproximadamente en el 50% de los carcinomas de colon. Al parecer, el evento que causa la activación de *ras* es la sustitución de un sólo aminoácido que resulta de mutaciones puntuales en los codones 12, 13 del primer exon y el codon 61 del segundo exon. Las mutaciones en *ras*, son comunes en tumores humanos y generalmente ocurren como un evento en etapas tempranas del proceso de tumorigénesis. Sin embargo, las razones de las diferencias de activación de *ras* en diferentes tipos de tumores no son claras. Probablemente, se involucra la exposición a diversos carcinógenos o mutágenos, así como las diferencias intrínsecas en el patrón de expresión de genes.⁵¹

La distribución de las mutaciones puntuales de *ras* parece ser que es independiente de la raza, sexo, edad o de la localización anatómica de los diferentes tumores. En general, la activación mutacional de *ras* se asocia frecuentemente a las etapas tempranas del desarrollo tumoral.^{5, 18, 51}

ALTERACIONES EN DCC

Se han identificado frecuentemente deleciones del brazo largo (q) del cromosoma 18 que contiene al gen *dcc* (deletion colon carcinoma). La pérdida del locus del *dcc* puede contribuir a los cambios en los antígenos superficiales, descritos en las células colorrectales cancerígenas. Esta conclusión se basa en la predicción de que el locus especifica una proteína con una secuencia de aminoácidos semejante al N-CAM (molécula de adhesión de células neuronales). La proteína codificada por el gen *dcc* posee una secuencia significativamente similar a las moléculas de adhesión de células neuronales así como a otras glicoproteínas de superficie celular relacionadas. Este tipo de moléculas actúan como mediadoras de las interacciones célula-célula y célula-sustrato y su función es muy importante en la regulación de el crecimiento y la diferenciación celular.^{18,40}

OTRAS ALTERACIONES GENÉTICAS

Se han encontrado otro tipo de alteraciones involucradas en el proceso del cáncer colorrectal. Por ejemplo se ha observado una pérdida significativa de grupos metilo en el DNA en etapas muy tempranas del cáncer colorrectal. A pesar de que los tumores colorrectales en general contienen hipometilaciones, existen algunas regiones específicas del genoma que se pueden encontrar hipermetiladas. Se ha observado que a la falta de metilación del DNA, se inhibe la condensación de los cromosomas y se puede llegar a la inadecuada separación mitótica, dando como resultado la pérdida o aumento de cromosomas.

También existen diferencias en la expresión o actividad de otros oncogenes como por ejemplo el oncogen *c-myc* que se sobreexpresa en la mayoría de los carcinomas colorrectales, especialmente en aquellos del colon descendente. Por otra parte se han visto elevadas las actividades tirosin-cinasa de proteínas específicas en muchos carcinomas colorrectales.³

Aparte, se han visto mutaciones o deleciones en diversas regiones de los cromosomas 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q y 22q en 25% a 50% de los casos estudiados.³

Existen otras alteraciones que, al realizar estudios posteriores, se podrá determinar si son causa o resultado del estado neoplásico.

La hipótesis de que el daño genético puede ser el responsable del cáncer, surgió de diversas bases: el reconocimiento de la predisposición hereditaria al cáncer, la detección de cromosomas dañados en células cancerígenas, la aparente conexión entre la susceptibilidad al cáncer y la capacidad afectada de las células para reparar daños en el DNA y la evidencia que relaciona el potencial mutagénico de algunas sustancias con su actividad carcinogénica. Todas estas causas diversas tienen una acción común, dañar el DNA de las células normales. En diversos tumores humanos el daño genético todavía es desconocido. Es posible que sea necesario diseñar otros métodos para localizar estos daños, estando conscientes de que es probable que no se encuentren, ya que no siempre existen. Así, como cada día se conoce mejor el genoma de las células cancerígenas, se espera adquirir nuevos recursos para la prevención, diagnóstico y terapia del cáncer; de esta manera, eventualmente se podrá lograr una meta más ambiciosa, la de conocer y comprender los diseños que ordenan la vida de nuestras células.¹⁹

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

LISTA DE REACTIVOS

I. REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA

- | | |
|---|--------------|
| • Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) | J.T. Baker |
| • Alcohol etílico absoluto | J.T. Baker |
| • Alcohol isoamílico | J.T. Baker |
| • Cloroformo | Merck |
| • Cloruro de sodio (NaCl) | J.T. Baker |
| • Dodecil sulfonato de sodio (SDS) | Sigma |
| • Fenol | Mallinckrodt |
| • 8-hidroxiquinolina | Mallinckrodt |
| • β -mercaptoetanol | Sigma |
| • Proteinasa K | Sigma |
| • Tris clorhidrato | Sigma |

II. REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS

- | | |
|---|------------|
| • Ácido bórico | Sigma |
| • Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) | J.T. Baker |
| • Agarosa | SeaKem |
| • Azul de bromofenol | Merck |

- Bromuro de etidio Sigma
- Glicerol Merck
- Tris base Sigma
- Xilen cianol FF Sigma

III. REACTIVOS PARA LA RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS TEJIDOS

- Cloruro de potasio Técnica Química
- Cloruro de sodio J.T. Baker
- Fosfato monobásico de potasio Mallinckrodt
- Fosfato dibásico de sodio Mallinckrodt
- Nitrógeno líquido

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DEL TEJIDO TUMORAL

- El DNA se extrae del tejido tumoral y normal que se recolecta después de la resección quirúrgica en el Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional S. XXI.
- Las muestras de tejido se enjuagan en una solución buffer de PBS estéril con objeto de eliminar lo mejor posible sangre y fluidos intestinales que pudiera contener la muestra.
- Las muestras ya lavadas, se almacenan en un tanque que contiene nitrógeno líquido a una temperatura de $-195.79\text{ }^{\circ}\text{C}$.²¹

SOLUCIONES UTILIZADAS

- a) 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.15 M NaCl (10-10-0.15 TEN)
- b) 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.65 M NaCl (10-10-0.65 TEN)
- c) Proteinasa K (10 mg/ml)
- d) 20% SDS
- e) Fenol
- f) Sevag: cloroformo- isoamílico 24:1
- g) Etanol absoluto
- h) 1 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA (1-1 TE)

Preparación de las soluciones

- a) 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.15 M NaCl (10-10-0.15 TEN)
Se pesaron 0.788 g de Tris clorhidrato, y se disolvieron en 250ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH 1 M y se llevó a un volumen de 300ml.

Por otro lado se pesaron 1.861g de EDTA y 4.35g de NaCl ; se disolvieron en los 300ml de la solución de Tris pH 7.5 y se aforó a un volumen de 500ml con agua destilada estéril.

b) 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.65 M NaCl (10-10-0.65 TEN)

Se pesaron 0.788 g de Tris clorhidrato, y se disolvieron en 250ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH 1 M y se llevó a un volumen de 300ml.

Por otro lado se pesaron 1.861g de EDTA y 18.85g de NaCl ; se disolvieron en los 300ml de la solución de Tris pH 7.5 y se aforó a un volumen de 500ml con agua destilada estéril.

c) Proteinasa K (10 mg/ml)

El frasco del producto comercial contiene 100 mg de Proteinasa K.

Se añadieron 10 ml de agua destilada estéril al contenido del frasco; posteriormente se guardó esta solución en alícuotas de 1 ml a -70 °C, con una concentración final de 10 mg/ml.

d) 20 % SDS

Se pesaron 10 g de SDS y se disolvieron en 50 ml de agua destilada.

e) Fenol

Se utilizó una solución de fenol a pH > 7.5, saturado con un buffer de Tris clorhidrato pH=8.0. La técnica de saturación se describe posteriormente.

f) Sevag : cloroformo-isoamílico 24:1

Se prepararon 500 ml de Sevag, mezclando 480 ml de cloroformo y 20 ml de alcohol isoamílico.

El cloroformo desnaturaliza proteínas y facilita la separación de la fase orgánica y de la fase acuosa, y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción.

g) Etanol absoluto

Se utilizó el producto comercial con una pureza del 99.9%.

h) 1 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA (1-1 TE)

Se pesaron 0.0788 g de Tris clorhidrato, y se disolvieron en 250ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH 1 M y se llevó a un volumen de 300ml.

Por otro lado se pesaron 0.186 g de EDTA , se disolvieron en los 300ml de la solución de Tris pH 7.5 y se aforó a un volumen de 500ml con agua destilada estéril.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DEL FENOL

El fenol se debe destilar a 168 °C para eliminar cualquier producto de oxidación que pudiera contener. Después de destilado, el fenol debe equilibrarse a un pH >7.8 ya que a un pH menor parte del DNA pasaría a la fase orgánica. ¹⁰

- El fenol debe almacenarse a -20 °C . Se saca del refrigerador, y se deja a temperatura ambiente ; después se funde a 68 °C . Una vez fundido, se le agrega hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. Este compuesto es un antioxidante, un inhibidor parcial de RNAsas, y un quelante débil de iones metálicos. Además, su color amarillo proporciona una forma de rápida identificación de la fase orgánica.
- Al fenol fundido, se le agrega un volumen igual de buffer Tris·Cl 0.5 M, pH 8.0 . La mezcla se agita, utilizando un agitador magnético, por espacio de 15 minutos. Después se coloca en un embudo de separación y se separa la fase orgánica de la acuosa.
- A la fase orgánica se le añade un volumen igual de buffer Tris·Cl 0.1 M , pH 8.0. La mezcla se agita en un agitador magnético por espacio de 15 minutos. Después se coloca en un embudo de separación y se separa la fase orgánica de la acuosa. Se repiten las extracciones hasta que el fenol tenga un pH >7.8.
- Cuando el fenol tiene aproximadamente un pH >7.8, se le añade 0.1 volumen de buffer Tris·Cl 0.1 M pH 8.0 que contenga 0.2% de β-mercaptoetanol, y se almacena en un frasco ámbar a 4°C por períodos de hasta un mes.

EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDO TUMORAL Y NORMAL

Para facilitar la extracción, la técnica se divide en cuatro etapas.

ETAPA 1: DIGESTIÓN CON PROTEINASA K Y SDS ^{11, 14, 47}

- Se pesan aproximadamente 0.1 - 0.2 g de tejido y se coloca la muestra en un tubo de propileno de 50 ml.
- Se agregan 5 ml de 10-10-0.15 TEN y se homogeniza a alta velocidad con el homogenizador de tejido (tissumizer) Tekmar, hasta la homogeneidad del tejido.
- Se agregan 100 μ l de proteinasa K 10 mg/ml (concentración final de 0.2 mg/ml) y se mezcla con una pipeta.
- Se agregan 125 μ l de SDS al 20% (concentración final de 0.5%). Se invierte cuidadosamente el tubo para mezclar la suspensión. Se debe formar una solución altamente viscosa. El detergente (SDS) y la enzima (proteínasa K) rompen la pared y la membrana celular, degradando el RNA y las proteínas celulares.¹⁴
- Se incuba la solución en un baño de agua a 65 °C durante aproximadamente 2 - 3 h.

*ETAPA 2: EXTRACCIÓN CON FENOL Y SEVAG*¹¹

- Se agregan 5 ml de 10-10-0.65 TEN . El tubo se invierte cuidadosamente para mezclar.
- Se agregan 10 ml de fenol. Se agita cuidadosamente y se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- La fase acuosa se pasa a otro tubo de 50 ml procurando no transferir la interfase. En caso de ser necesario, se debe repetir la extracción de la fase acuosa con fenol.
- Se agregan 10 ml de Sevag. Se agita cuidadosamente y se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se elimina la fase orgánica.

*ETAPA 3: PRECIPITACIÓN CON ETANOL*¹¹

- Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de 50 ml y se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcla suavemente invirtiendo el tubo varias veces. Se debe formar un precipitado fibroso denso. Se recoge el precipitado con una pipeta Pasteur en forma de "U".
Si el precipitado no es denso, es necesario centrifugar el tubo para recuperar el DNA.
- Se lava el DNA adherido a la pipeta y/o la pastilla formada después de centrifugar, primero con una solución que contenga 70% de etanol en 10-10-0.15 TEN, después con otra solución similar y por último en etanol absoluto.
- Se debe secar el precipitado, presionándolo muy suavemente con un papel filtro con objeto de quitar el exceso de etanol.
- Se resuspende el DNA en el menor volumen posible de 1-1 TE.

- Para facilitar la resuspensión se puede incubar el tubo a 37 °C en un baño de agua durante toda la noche.

ETAPA 4: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN¹⁰

- Se toma una alícuota de la suspensión de DNA (1-5 μ l), se mezcla con 0.5 ml de 1-1 TE y se colocan a la celda de lectura.
- Se determina la absorbencia a 260 y 280 nm usando como blanco de lectura una solución 1-1 TE .
- Se determina la concentración de DNA utilizando la siguiente relación:
20 A = 1 mg/ml de DNA
Abs 260nm = X mg/ml de DNA
- El DNA se almacena a 4 °C.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .¹⁰

PREPARACIÓN DEL GEL :

- Se sellan con cinta adhesiva las orillas de una placa de vidrio limpia y seca para soportar el gel.
- Se prepara una cantidad suficiente de buffer electrodo TBE 0.5X para llenar la cámara de electroforesis y para la preparación del gel. Para preparar una solución concentrada del buffer se pesan las siguientes cantidades de los reactivos:

TBE 5X : 54g de Tris base

27.5g de ácido bórico

20ml de EDTA 0.5 M (pH=8.0)

Esta solución se afora a 1000 ml y, para trabajar, se prepara una dilución 1:10.

- En un matraz Erlenmeyer, se pesan 0.06g de agarosa en polvo y se agregan 10 ml de la solución TBE 0.5X . Se tapa el matraz con un tapón que le quede flojo y se calienta en el horno de microondas por aproximadamente 40 seg. Se agita hasta que no queden grumos en la solución ni granos de agarosa pegados en las paredes del matraz. Se añaden a la solución 5 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml.
- Se deja enfriar un poco la solución y se vacía con una pipeta a la placa de vidrio . Se debe observar que en el gel no se formen burbujas. Se coloca el peine a 1 cm de distancia de la orilla superior y a 0.5-1 mm arriba de la solución para que los pozos tengan una profundidad adecuada.
- Ya que el gel haya solidificado, se le quita el peine cuidadosamente y se coloca en la caja para la electroforesis.

ELECTROFORESIS

- El gel ya sólido se coloca en la cámara de electroforesis y se le agregan aproximadamente 500 ml de buffer TBE 0.5X, suficiente para que el gel quede sumergido en la solución aproximadamente 1mm.
- Se mezclan las muestras del DNA con el buffer de corrimiento deseado; en este caso se utilizó el siguiente:
 - 0.25% de azul de bromofenol
 - 0.25% de xilencianol FF
 - 30% de glicerol en aguaEl buffer de carga se utiliza con tres propósitos: incrementa la densidad de la muestra, asegurando que el DNA se sumerja en los pozos del gel; proporciona color a la muestra haciendo más sencillo el seguimiento de la electroforesis, pues de lo contrario sería muy difícil determinar la distancia que ha migrado la muestra de DNA, ya que ésta es incolora y sólo es visible bajo una fuente de luz ultravioleta; y contiene reactivos, que en un campo eléctrico, migran hacia el ánodo en rangos que están reportados en la literatura.
- La muestra con el buffer se carga lentamente en los pozos del gel sumergido utilizando una micropipeta Gilson y se procede a migrar la electroforesis aplicando un voltaje de 50mV, por aproximadamente 3-4h. El DNA migrará hacia el ánodo. Se verifica que los cables se hayan colocado correctamente, observando si hay la formación de burbujas en el ánodo y en el cátodo; después de unos minutos, debe empezar a migrar el bromofenol de los pozos hacia el cuerpo del gel. El corrimiento se detiene cuando el segundo colorante migra a 3-4cm antes del final del gel.
- Se apaga la corriente eléctrica y se quitan los cables. Se retira cuidadosamente el gel para examinarlo bajo luz ultravioleta, en un transiluminador, a una λ de 300nm.

5. RESULTADOS

Se llevó a cabo la recolección de 20 muestras de tumores colorrectales con sus respectivos controles de tejido normal en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional S.XXI. Los fragmentos se recibieron entre 30 minutos y 2 horas de la resección quirúrgica, lavándose inmediatamente con una solución de PBS estéril con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de sangre y fluidos corporales indeseables. Ya enjuagados, los fragmentos de tejido tumoral y normal se congelaron en nitrógeno líquido a -195°C y se mantuvieron almacenados en estas condiciones hasta el momento de la extracción de DNA.

De cada muestra se tomaron aproximadamente de 0.5 a 1 g de tejido y el DNA se extrajo utilizando la técnica de la proteinasa K ⁴⁷, descrita en el capítulo anterior (materiales y métodos). Después de la extracción, las muestras de DNA se resuspendieron en un volumen de aproximadamente 0.5 ml de buffer TE (1-1M).

Se determinó a partir de métodos espectrofotométricos la pureza de cada muestra, tomando una alícuota de la suspensión, leyendo las absorbencias a 260nm y 280nm y posteriormente calculando la relación 260/280. Para considerar el DNA de una pureza adecuada, esta relación debe dar un resultado entre 1.7 y 2.0. Si la relación resulta menor de 1.7, esto indica que la muestra contiene una cantidad significativa de proteínas, por lo que se debe reextraer, añadiendo SDS 0.5% y fenol. Se reprecipita el DNA con etanol absoluto y se vuelve a determinar la pureza, hasta que la relación 260/280 sea mayor o igual a 1.7.¹⁰ En general, se considera que una buena parte de las muestras obtenidas poseen una buena pureza ya que la relación 260/280 se encuentra en el intervalo 1.7-2.0 (Tabla 5.1).

A partir del resultado de la absorbencia a 260nm se calculó la concentración en mg/ml de DNA, de acuerdo a la siguiente relación¹⁰:

1 A₂₆₀--50µg/ml de DNA

X A₂₆₀-- ? µg/ml de DNA

Con este dato y con la estimación del volumen total de la muestra, se calculó la concentración de DNA en mg, con el fin de conocer la cantidad total de DNA obtenido del tejido del que se extrajo.

Posteriormente, se cuantificó la integridad y el tamaño del DNA extraído, por electroforesis en geles de agarosa. Los resultados se muestran en las Figs. 5.1, 5.2 y 5.3. Se utilizó como control el DNA del fago λ sin digerir. El tamaño del fragmento mayor de DNA del fago λ es de 43 kb. En general, el DNA extraído posee un tamaño superior a 43 kb, ya que este es DNA genómico, además de encontrarse relativamente íntegro. La integridad del DNA nos puede indicar que las células de estos tejidos no presentaron muerte celular programada o apoptosis, ya que una de las características de ésta es la fragmentación del DNA.

Por otro lado se llevó a cabo la recopilación de los datos clínicos de los pacientes de los que se recolectaron muestras de tejido del Hospital de Oncología del C. M. N., S. XXI y de las que se ha obtenido DNA. Estos se presentan clasificados de acuerdo al diagnóstico, es decir, de acuerdo al tipo de cáncer colorrectal que presentan: FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar, Tabla 5.2), HNPCC (Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipoideo, Tabla 5.3) o esporádico (Tabla 5.4).

En estas tablas se incluyen los siguientes datos: edad, sexo, localización del tumor (esto es, si el tumor se encuentra del lado derecho o del lado izquierdo del colon), clasificación de Duke's¹³; este método de clasificación se basa en la infiltración a la pared abdominal y en la presencia o ausencia de metástasis ganglionares. De acuerdo con esta clasificación se tiene:

Tipo A. Invasión a la submucosa y músculo, sin metástasis ganglionares o distantes.

Tipo B. Invasión a la serosa sin metástasis ganglionares o a distancia.

Tipo C. Invasión a través de la serosa y compromiso de los ganglios regionales.

Tipo D. Metástasis a distancia.

También se incluyen en las tablas los datos del tratamiento que recibieron los pacientes (quimioterapia o radioterapia), recurrencia, metástasis y muerte.

TABLA 5.1. PUREZA Y RENDIMIENTO DEL DNA OBTENIDO DE LAS MUESTRAS TUMORALES Y DE SUS RESPECTIVOS TEJIDOS NORMALES

Nº de muestra	A 260nm	A 280nm	Relación 260/280	Concentración de DNA (mg/ml)	mg totales de DNA
T 70	0.137	0.071	1.929	0.685	0.822
N 70	0.114	0.059	1.926	0.571	0.743
T 72	0.665	0.340	1.955	3.325	1.330
T 72 frag.	0.365	0.182	2.005	1.828	0.731
N 72	0.213	0.101	2.098	1.066	0.426
T 76	0.543	0.282	1.925	2.718	1.087
N 76	0.227	0.147	1.546	1.136	0.227
T 80	0.363	0.229	1.583	1.818	0.272
N 80	0.140	0.080	1.739	0.701	0.245
T 88	0.466	0.246	1.894	2.333	0.350
T 88 frag.	0.373	0.223	1.670	1.868	0.372

T (DNA Tumoral), N (DNA Normal), frag. (DNA fragmentado), A260 (Absorbencia a 260 nm), A280 (Absorbencia a 280 nm).

TABLA 5.1. PUREZA Y RENDIMIENTO DEL DNA OBTENIDO DE LAS MUESTRAS TUMORALES Y DE SUS RESPECTIVOS TEJIDOS NORMALES (CONTINUACIÓN)

Nº de muestra	A 260nm	A 280nm	Relación 260/280	Concentración de DNA (mg/ml)	mg totales de DNA
N 88	0.234	0.126	1.850	1.171	0.117
T 90	0.389	0.255	1.526	1.946	0.778
N 90	0.431	0.302	1.425	2.156	0.646
T 96	0.556	0.290	1.913	2.781	0.556
N 96	0.340	0.191	1.778	1.701	0.510
T 100	0.514	0.276	1.862	2.573	1.801
N 100 (1)	0.149	0.093	1.600	0.740	0.185
N 100 (2)	0.337	0.208	1.617	1.685	1.011
T 104	0.304	0.160	1.902	1.521	0.304
N 104 (1)	0.127	0.071	1.780	0.635	0.127
N 104 (2)	0.390	0.234	1.664	1.950	0.390

T (DNA Tumoral), N (DNA Normal), frag. (DNA fragmentado), A260 (Absorbencia a 260 nm), A280 (Absorbencia a 280 nm).

TABLA 5.1. PUREZA Y RENDIMIENTO DEL DNA OBTENIDO DE LAS MUESTRAS TUMORALES Y DE SUS RESPECTIVOS TEJIDOS NORMALES (CONTINUACIÓN)

Nº de muestra	A 260nm	A 280nm	Relación 260/280	Concentración de DNA (mg/ml)	mg totales de DNA
T 108	0.310	0.159	1.943	1.551	0.465
N 108	0.246	0.132	1.859	1.233	0.369
T 110 (1)	0.393	0.198	1.984	1.968	0.157
T 110 (2)	0.479	0.246	1.948	2.396	1.198
N 110	0.260	0.139	1.868	1.301	1.952
T 116	0.343	0.240	1.430	1.715	0.514
N 116	0.212	0.154	1.376	1.066	0.533
T118	0.348	0.216	1.611	1.743	1.743
N118	0.318	0.208	1.528	1.598	0.750
T120	0.130	0.079	1.645	0.654	0.392
N120	0.210	0.143	1.468	1.056	0.529

T (DNA Tumoral), N (DNA Normal), frag. (DNA fragmentado), A260 (Absorbencia a 260 nm), A280 (Absorbencia a 280 nm).

TABLA 5.1. PUREZA Y RENDIMIENTO DEL DNA OBTENIDO DE LAS MUESTRAS TUMORALES Y DE SUS RESPECTIVOS TEJIDOS NORMALES (CONTINUACIÓN)

Nº de muestra	A 260nm	A 280nm	Relación 260/280	Concentración de DNA (mg/ml)	mg totales de DNA
T 122	0.179	0.107	1.672	0.895	0.626
N 122	0.259	0.158	1.639	1.295	0.906
T 124	0.434	0.269	1.614	2.176	0.761
N 124	0.310	0.185	1.675	1.552	0.623
T 128	0.466	0.264	1.765	2.334	0.933
N 128	0.366	0.212	1.726	1.834	0.733
T 132	0.583	0.337	1.730	2.915	1.457
N 132	0.271	0.169	1.603	1.085	0.379
T 134	0.635	0.408	1.556	3.175	1.587
N 134	0.359	0.209	1.717	1.795	0.538
T 136	0.634	0.406	1.561	3.173	1.903
N136	0.423	0.253	1.671	2.115	0.951

T (DNA Tumoral), N (DNA Normal), frag. (DNA fragmentado), A260 (Absorbencia a 260 nm), A280 (Absorbencia a 280 nm).

TABLA 5.2. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON FAP

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Duke's	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Muerte
74	31	M	I/D	NR	-	NR	NHF	NO
94	32	F	I	B2	-	NO	NO	NO
96	27	M	I	B2	NR	NO	NO	NO

FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar); M,F(masc. o fem.); I,D (izq. o der.); NR (no reportado); +(recibió) o - (no recibió); NHF (no hasta la fecha de la recolección de los datos).

TABLA 5.3. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON HNPCC

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Duke's	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Muerte
82	49	F	D	B2	-	SI	SI	NO
84	53	M	D	B2	+	NO	SI	NO

HNPCC (Cáncer colorrectal hereditario no polipoideo);M,F(masc. o fem.); I,D (izq. o der.); NR (no reportado); +(recibió) o - (no recibió); NHF (no hasta la fecha de la recolección de los datos).

TABLA 5.4. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER ESPORÁDICO

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Duke's	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Muerte
70	62	F	D	B2	NR	NO	NR	NO
72	75	F		C3	+	SI	NR	NR
76	81	F	I	C2	+	NR	SI	NO
78*	84	M	I	B2	NR	NR	NR	SI
80	43	M	I	B2	+	NO	NO	NO
86	71	F	I	B2	+	NO	NO	NO
88	72	F	I	B2	+	NO	NO	SI
90**	60	M	I/D	B1	-	NO	SI	NO
98	63	F	D	C2	NR	NO	NO	NO
100	62	M	I	B2	+	NO	NO	NO
104	45	M	I	A	+	NO	NO	NO
106	70	M	I	B1	+	NO	NO	NO

* (linfoma); ** (doble primario); M,F(masc. o fem.); I,D (izq. o der.); NR (no reportado); +(recibió) o - (no recibió); NHF (no hasta la fecha de la recolección de los datos).

TABLA 5.4. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER ESPORÁDICO (Continuación)

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Duke's	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Muerte
108	64	M	D	C2	+	SI	SI	NR
110	65	M	I	D	+	NO	SI	SI
116	86	F	I	B2	+	NO	NO	NO
118	62	F	I	C2	+	SI	NO	NO
120	51	M	I		+	NO	NO	NO
122	62	F	I	B2	NR	NO	NR	NR
124	63	M	I		+	NO	NO	NO
128	88	M	I	B2	-	NO	NO	NHF
132	61	F	D	C2	+	NO	NO	NO
134	60	M			+	SI	NO	NO
136	59	F	I		+			

* (linfoma); ** (doble primario); M,F (masc. o fem.); I,D (izq. o der.); NR (no reportado); +(recibió) o - (no recibió); NHF (no hasta la fecha de la recolección de los datos).

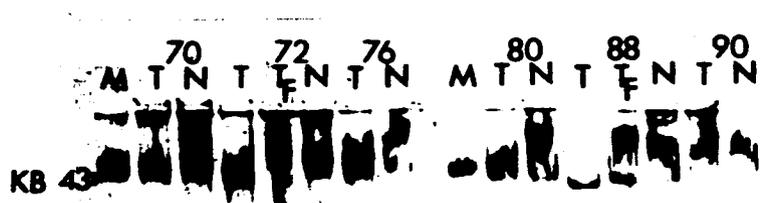


FIG. 5.1

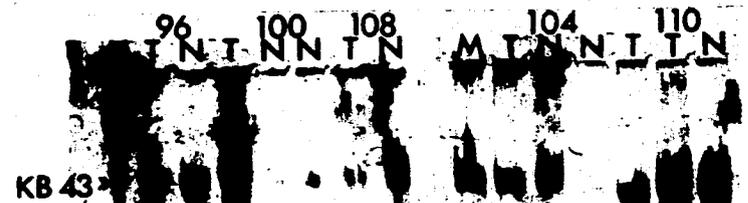


FIG. 5.2

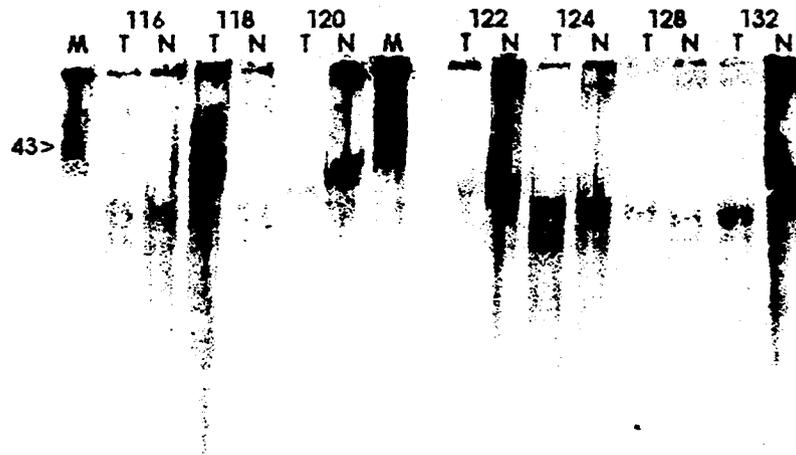


FIG. 5.3

6. DISCUSIÓN

La técnica de la proteinasa K que se utilizó en este trabajo, resultó ser una técnica adecuada para la extracción de DNA de alto peso molecular de tejido tumoral y normal. Además de ser una técnica accesible económicamente, es bastante rápida y de fácil manipulación. Se deben cuidar ciertos parámetros en el manejo de las soluciones que contienen DNA, como la agitación suave de la mezcla, ya que de lo contrario se puede ocasionar que el DNA se rompa en fragmentos de menor peso molecular que el deseado. También se debe cuidar que el tejido una vez que ha salido del nitrógeno líquido, permanezca a temperaturas menores de 4°C, hasta que llegue el momento de la incubación a 65°C con la proteinasa K.⁴⁷

La concentración en miligramos totales de DNA se encuentra desde 0.117mg hasta 1.952mg, siendo la media 0.733mg. El 35.55% de las muestras están por debajo de la concentración total promedio, mientras el 64.66% de las muestras están por arriba de esta concentración total promedio. El DNA se obtuvo en cantidades suficientes para poder efectuar análisis de la presencia de mutaciones en ciertos genes, como c-ki-ras; estudios de este tipo se podrán realizar posteriormente con la ventaja de que el DNA puede ser amplificado por la técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).⁴⁸

La pureza del DNA es suficiente y aunque varía de un rango de relación 260/280 de 1.37 a 2.09, el 60% de tumores presentan excelente pureza.

La pureza del DNA no es indispensable para los experimentos que se realizarán posteriormente, ya que utilizando la técnica de PCR se podrán

amplificar regiones determinadas de DNA limitadas por "primers" o cebadores específicos de esa misma región.

En relación a los geles de agarosa, se observa que en general, las muestras de DNA presentan alto peso molecular. En algunos carriles se aprecia un cierto grado de degradación de DNA y éste se podría atribuir a algún manejo brusco de las muestras durante la extracción o a que las muestras fueron congeladas y descongeladas varias veces, por lo que el DNA pudo ir fragmentándose gradualmente. Sin embargo, teniendo una cantidad suficiente de DNA de alto peso molecular, se puede realizar la amplificación de la región de interés, sin importar que la muestra se encuentre parcialmente degradada.

De los datos clínicos de los pacientes, se puede observar como primer punto que solamente 3 casos presentan FAP y 2 casos presentan HNPCC, lo que indica que sólo el 17.85% de estos pacientes presentan algún tipo de padecimiento colorrectal hereditario. El otro 82.1% de pacientes presenta un tipo de cáncer esporádico, que surgió por alguna causa relativamente ajena a la herencia de los individuos.

Se puede observar que en los pacientes con FAP (Tabla 5.2), el tumor primario se localiza preferencialmente del lado izquierdo. La edad de estos pacientes va de 27 a 32 años, con promedio de 30.5 años. El 66.6% de estos pacientes son de sexo masculino y el 33.3% son de sexo femenino. La clasificación de Duke's de estos tumores es predominantemente B2 (66.6%), aunque en el tumor 74 no se define una clasificación.

En los pacientes con HNPCC (Tabla 5.3) el predominio de localización es de lado derecho del colon (100%) y la edad de los pacientes va desde los 49 a 53 años, teniendo una edad promedio de 51 años. En este caso, el 50% de los pacientes son de sexo masculino mientras el otro 50% son de sexo femenino. En estos pacientes coincide la etapa de clasificación de Duke's, ya que el 100% de ellos son B2.

Los pacientes con cáncer esporádico (Tabla 5.4) presentan tumores predominantemente de lado izquierdo del colon ya que el 74% de los tumores se encuentra de este lado y sólo el 26% se presenta de lado derecho. La edad de estos pacientes va desde 36 hasta 84 años, siendo la edad promedio de 60 años.

El 48% de estos pacientes son de sexo femenino, mientras que el 52% son de sexo masculino. La etapa de clasificación de Duke's es muy variable ya que los tumores en estos pacientes tienen etiologías diferentes, es decir, se reseccionaron

a diferentes tiempos de surgimiento del tumor, además de diferentes tratamientos, diversas causas por las que estos tumores aparecieron, como la diferencia en el estrato social de los pacientes, variabilidad en la alimentación, etc.

La población de DNA de tumores obtenidos, aunque es limitada, resulta interesante ya que permite que posteriormente se continuen estudios acerca de la expresión genética del cáncer colorrectal, como por ejemplo el análisis de mutaciones de los genes c-ki-ras, p53 u otros, así como de la expresión de algunas proteínas como c-Myc, Apc, etc. El establecimiento de este banco de DNA, da la pauta para realizar estudios posteriores acerca de la biología molecular del cáncer colorrectal de la población mexicana.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7. CONCLUSIONES

En este estudio se logró el cumplimiento de los objetivos propuestos al inicio y podemos concluir de este trabajo lo siguiente:

a) Se obtuvo el DNA de 20 muestras de tejido colorrectal tanto tumoral como normal. El 60% de estas muestras presentan una excelente pureza y el 40% restante presentan una pureza adecuada. Las muestras, en general, son de alto peso molecular, aunque en algunos casos existe cierta degradación del material genómico. El DNA se extrajo en cantidad suficiente para poder llevar a cabo estudios diversos con estas muestras.

b) Se obtuvo la información del expediente clínico de los pacientes en el Archivo de Hospital de Oncología del C. M. N., S. XXI, donde se incluyeron datos como edad, sexo, localización del tumor, etapa de clasificación de Duke's, tratamiento radio o quimioterapéutico, recurrencia, metástasis y muerte. Estos datos se clasificaron de acuerdo al tipo de cáncer colorrectal que presentaron los pacientes, siendo los principales el FAP, el HNPCC y el esporádico. El 82.1% de los pacientes presentaron cáncer esporádico y el 17.85% restante presentaron alguno de los tipos de cáncer colorrectal hereditario mencionados anteriormente. El 60% de los pacientes con cáncer colorrectal hereditario son del sexo masculino y el 40% son de sexo femenino; de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico el 52.17%

son del sexo masculino y de sexo femenino son el 47.82% restante. La edad de los pacientes con cáncer hereditario fué menor de 60 años en el 100% de los casos, mientras que el 82.6% de los pacientes con cáncer esporádico fué mayor de 60 años. La localización del tumor primario fué predominantemente del lado izquierdo del colon, siendo los porcentajes el 60% en los pacientes con cáncer hereditario (FAP) y el 73.91% de los pacientes con cáncere esporádico.

c) Se estableció un banco de 20 muestras de DNA proveniente de pacientes mexicanos con cáncer colorrectal.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera L., Luna P., Villarreal JR., et al (1991): Perspectives in Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Oncology Supplement* 2: 92-103.
2. Carbone David P.(1993): Oncogenes and Tumor Supressor Genes. *Hospital Practice*.
3. Fearon E.R., Vogelstein B.(1990): A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
4. Hackford Alan W. (1993): Biochemical Markers for Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America* , Vol. 73, Num. 1, 85-102.
5. Capella G., Cronauer-Mitra S., Peinado M.A. & Perucho M. (1991): Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the C-ki-ras Gene in Human Tumors. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 93, 125-131
6. Milsom Jeffrey W. (1993): Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America*, Vol. 73, Num. 1, 1-11.
7. Young Theresa B., Wolf Dennis A.(1988): Case-control Study of Proximal and Distal Colon Cancer and Diet in Wisconsin. *International Journal of Cancer* 42, 167-175.

8. Miller A.B., Berrino F., et al. (1994): Diet in the Aethiology of Cancer: a Review. *European Journal of Cancer*. Vol 30A, No.2, 207-220.
9. Georgiannos S. N., Weston P.M.T. & Goode A.W. (1993): Micronutrients in Gastrointestinal Cancer. *British Journal of Cancer* 68, 1195-1198.
10. Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1989): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Chaka C. I., Randail K. s., et al (1987): Analysis of DNA Extracted from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Enzymatic Amplification and Hybridization with Sequence-Specific Oligonucleotides. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. Vol. 142, N° 3, 710-716.
12. Moosa A.R., Schimpff S.C. & Robson M.C.(1991): *Comprehensive Textbook of Oncology*. Volume one. Second edition, Williams & Wilkins, p. 916-918.
13. Rubin P., et al. (1978): *Oncología Clínica, un Enfoque Terapeutico Multidisciplinario*. Quinta edición, Sociedad Americana del Cáncer.
14. Cassandra L., Smith and Cantor Charles (1987): Preparation and Manipulation of Large DNA Molecules: Advances and Applications. *TIBS* 12, 284-287.
15. Harris Curtis C. : *Tumor Supressors, Oncogenes and Human Cancer ; National Cancer Institute (Plenary Lectures)*.
16. Vogelstein B., et al (1989): *Genetic Alterations Accumulate During Colorectal Tumorigenesis*. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. M. de Kok, Pachen D., et al (1993): Case-Control Study on Fecapentaene Excretion and Adenomatous Polyps in the Colon and Rectum. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 85, N° 15, 1241-1243.

18. Hackford Alan W. (1993): Biochemical Markers for Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America*. Vol. **73**, N° 1, 85-102.
19. Bishop J. Michael (1987): The Molecular Genetics of Cancer. *Science*, Vol. **235**, 305-311.
20. Vogelstein B., Fearon E., et al. (1988): Genetic Alterations During Colorectal Tumor Development. *The New England Journal of Medicine*, Vol. **319**, N° 9, 525-532.
21. The Merck Index (1989). Eleventh edition, Merck & CO. Inc.
22. Seytz H.K., Simanowski U.A. & Wright N.A. (1991): Colorectal Cancer, From Pathogenesis to Prevention?. First edition, Spring-Verlag.
23. Lynch P.M., Wargovich M.J., et al. (1991): A Follow-up Study of Colonic Epithelial Proliferation as a Biomarker in a Native-American Family with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol.**83**, N° 13, 951-954.
24. Lynch H.T., Lanspa S., et al. (1991): Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndromes I and II). *Cancer Genet Cytogenet* **53**: 143-160
25. Fishel R., Lescoe M.K., et al. (1993): The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and Its Association with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Cell* **75**, 1027-1038.
26. Hall N.R., Murday V.A., et al. (1994): Genetic Linkage in Muir-Torre Syndrome to the Same Chromosomal Region as Cancer Family Syndrome. *European Journal of Cancer*, Vol. **30A**, N° 2, 180-182.
27. Aaltonen L.A., Peltomäki P., et al. (1994): Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients. *Cancer Research* **54**, 1645-1648.

28. Leppert M., Dobbs M., et al. (1987): The Gene for Familial Polyposis Coli Maps to the Long Arm of Chromosome 5. *Science* **238**, 1411-1413.
29. Cannon-Albright L., Thomas T., et al (1989): Characteristics of Familial Colon Cancer in a Large Population Data Base. *Cancer* **64**, 1971-1975.
30. Kinzler K.W., Nilbert M.C., et al. (1991): Identification of FAP Locus Genes from Chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-664.
31. Kinzler K.W., Nilbert M.C., et al (1991): Identification of a Gene Located at Chromosome 5q21 That is Mutated in Colorectal Cancers. *Science* **251**, 1366-1370.
32. Nishisho I., Nakamura Y., et al (1991): Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Patients. *Science* **253**, 665-669.
33. Groden J., Thliveris A., et al (1991): Identification and Characterization of the Familial Adenomatous Polyposis Coli Gene. *Cell* **66**, 589-600.
34. Gerdes H., Urmacher C., et al (1993): Expansion of the Epithelial Cell Proliferative Compartment and Frequency of Adenomatous Polyps in the Colon Correlate with the Strength of Family History of Colorectal Cancer. *Cancer Research* **53**, 279-282.
35. Wilcox G.M., Anderson P.B., et al (1986): Early Invasive Carcinoma in Colonic Polyps. *Cancer* **57**, 160-171.
36. Rozen P., Lynch H.T., et al (1987): Familial Colon Cancer in the Tel-Aviv Area and the Influence of Ethnic Origin. *Cancer* **60**, 2355-2359.
37. Remvikos Y., Muleris M., et al (1988): DNA Content and Genetic Evolution of Human Colorectal Adenocarcinoma. A Study of Flow Cytometry and Cytogenetic Analysis. *Int. J. Cancer* **42**, 539-543.
38. Preston-Martin S., Pike M. C., et al (1990): Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer. *Cancer Research* **50**, 7415-7421.

39. Sporn Michael B. (1991): Carcinogenesis and Cancer: Different Perspectives on the Same Disease. *Cancer Research* **51**, 6215-6218.
40. Fearon E.R., Cho K.R., et al (1990): Identification of a Chromosome 18q Gene That Is Altered in Colorectal Cancers. *Science* **247**, 49-56.
41. Gallick G. E., García R. A., Staley C. A., Moskal T. L., Huang S. and Chakrabarty S. (1994): Molecular Alterations During Colon Tumorigenesis: An Overview of Growth Regulatory Pathways and Potential Therapeutic Implications. *Cancer Bull.* **46**, 296-302.
42. Cuthill Scott (1994): Cellular Epigenetics and the Origin of Cancer. *BioEssays* **16**, N° 6, 393-394.
43. Statland Bernard E. (1992): Nutrition and Cancer. *Clin. Chem* **38**, N° 8, 1587-1594.
44. Klurfeld David M. (1992): Dietary Fiber-mediated Mechanisms in Carcinogenesis. *Cancer Research (suppl.)* **52**, 2055s-2059s.
45. Newmark Harold L. & Lipkin Martin (1992): Calcium, Vitamin D and Colon Cancer. *Cancer Research (suppl.)* **52**, 2067s-2070s.
46. Brison Olivier (1993): Gene Amplification and Tumor Progression. *Biochimica et Biophysica Acta* **1155**, 25-41.
47. Blin N. and Stafford D. M. (1976): A General Method for Isolation of High Molecular Weight DNA from Eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **3**: 2303-2308.
48. Innis Michael A., Gelfand David H., Sninsky John J. and White Thomas J. (1990): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 13-19.

49. Gerson Baum Cynthia (1994): La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Algunas Aplicaciones Clínicas. Tesis, Facultad de Química, U.N.A.M.

50. Minamoto T., Sawaguchi K., Mai M., Yamashita N., Sugimura T and Esumi H. (1994): Infrequent K-ras Activation in Superficial-Type (Flat) Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Cancer Res* **54**, 2841-2844.

51. Kahn S., Yamamoto F., Almoguera C., Winter E., Forrester K., Jordano J. and Perucho M. (1987): The c-K-ras Gene and Human Cancer (Review). *Anticancer Research* **7**, 639-652.

APENDICE I (ABREVIATURAS)

°C	grados centígrados
A	Absorbencia
APC	Adenomatous Poliposis Coli
Da	Daltons
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAP	Poliposis Adenomatosa Familiar
g	gramos
GDP	Difosfato de guanina
GTP	Trifosfato de guanina
h	horas
HNPCC	Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipoideo
λ	longitud de onda
M	molar
MCC	Mutated in Colorectal Cancer
μg	microgramos
mg	miligramos
μl	microlitros
ml	mililitros
mM	milimolar

mV	millivolts
N	Tejido normal
N-CAM	Molécula de adhesión de células neuronales
NaCl	Cloruro de sodio
nm	nanómetros
p	Brazo corto del cromosoma
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Poimerasa
q	Brazo largo del cromosoma
QT	quimioterapia
r.p.m.	revoluciones por minuto
RER	Errores de reparación en la replicación
RNA	Ácido ribonucleíco
RNAasa	Nucleasa del ácido ribonucleíco
RT	Radioterapia
SDS	Dodecil Sulfonato de Sodio
T	Tejido tumoral
TBE	Buffer de Tris-boratos-EDTA
TE	Buffer de Tris-EDTA
TEN	Buffer de Tris-EDTA-NaCl
UV	Radiación ultravioleta