

00562

8  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE MUTACIONES EN LOS  
CODONES 12, 13 Y 61 DEL GEN K-ras EN TUMORES  
COLORRECTALES DE PACIENTES MEXICANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS  
( B I O Q U I M I C A )  
P R E S E N T A :  
JULIA JEANETT SEGURA URIBE

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANGELINA QUINTERO RUIZ

271725



MEXICO, D. F.

1999

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.

AGRICULTION

DISCOMITURA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Angelina Quintero Ruíz y con el apoyo de una beca para estudios de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

*"Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría,  
y que obtiene la inteligencia;  
porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata,  
y sus frutos más que el oro fino."*

Proverbios 3:13-14

*"El temor de Jehová es el principio  
de la sabiduría,  
y el conocimiento del Santísimo es  
la inteligencia"*

Proverbios 9:10

## DEDICATORIAS

A Christian mi esposo, mi compañero, mi amigo, mi lugar... No tengo palabras para decirte TODO lo maravilloso que significas para mí. Gracias por estar conmigo! Je t'aime!

A mis padres Julia y Santiago, saben que los amo y les agradezco el apoyo y su amor de toda la vida!

A mi querida abuela zapatona, Doña Feli, porque siempre has estado en todo momento para consentirme y apoyarme durante toda mi vida. Te quiero muchísimo!

A mis pequeños latosos, David, Santiago, Arturo y Raúl, los adoro!

A toda mi familia, tíos, tías, primos, primas; gracias por el apoyo que siempre me han brindado.

A toda la familia Guerra Araiza, gracias por recibirme como parte de ustedes. Son mi segunda familia.

A todos mis amigos: Verónica Rivera, Laura Pedrero, Juan Ramón Sánchez, Juan Carlos Zárraga, Verónica Ortiz,...., quienes siempre han estado conmigo, en los buenos momentos y en los no tan buenos. Este es uno de los buenos momentos que les dedico con mucho cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. Angelina Quintero Ruiz, por la brillante dirección, asesoría y empeño que me inculcó para la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón por haber depositado su confianza en mí. Gracias por todo su apoyo. Espero no haberlo decepcionado.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, gracias por tu amistad, sinceridad y apoyo incondicional.

Al Dr. Pedro Luna, al Dr. Héctor Santiago Payán y a los médicos del departamento de Patología del Hospital de Oncología C. M. N., S. XXI (IMSS), ya que sin su colaboración para otorgar el material biológico hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

Al Dr. Hugo Barrera y la Dra. Agnes Revol de Mendoza, por las facilidades que me brindaron para la realización de una parte de las secuencias de este trabajo.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su cooperación tanto en lo material, como en las críticas y evaluaciones de este proyecto, así como por su amistad.

A la Dra. Rossana Sánchez por su amable colaboración para llevar a cabo los experimentos de secuenciación.

Al Dr. Mauricio Salcedo por su increíble amistad y por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Armando Tovar, quien gentilmente nos permitió utilizar su equipo para poder realizar una parte de los experimentos de amplificación.

Al Dr. Javier Plasencia por su apoyo para la síntesis de una parte de los oligonucleótidos que se ocuparon en los experimentos.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre, miembro del comité tutorial, por sus valiosas críticas y aportaciones para el mejor desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos, Dr. Roberto Hernández Fernández, Dra. Ma. Teresa Tusié Luna, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dr. Benny Weiss Steider, miembros del jurado, por el tiempo que invirtieron en la revisión y crítica de la tesis. Gracias por sus comentarios que fueron de beneficio para el mejoramiento de este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio de Biología Molecular, mis amigos: Abelardo, José, Irene, Vanessa G., Sara, Andrea, Gaby, Mauricio, Jorge, Francis, Adriana, Ana Ma., Lupita Reyes, Dr. García Tamayo, Margarita...gracias por compartir un espacio tan importante de mi vida.

A mis queridos amigos de la maestría, porque compartimos juntos tantas horas de sufrimiento y esfuerzo: Euclides, Pili, Claudia, Rosi, Lupita, José Luis...

A mis Luckis amigos, gracias por hacer de la vida un lugar ameno: Alfredo H., Iván M., Carlos F. y Mauricio S.

A todos los miembros de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme su apoyo durante mi estancia en Monterrey.

Particularmente a mis amigos los Mtys, Irma, Ana, Karen, demás muchachas, Martín, Mario, Genaro, etc, por haberme recibido en su Ciudad y haberme hecho sentir como si estuviera en casa. Muchas Gracias!!!

A los miembros del laboratorio de cáncer en Biomédicas: Néstor, Miriam, Salomón, Manuel R., Marcela L., les agradezco su ayuda y su amistad.

Especialmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, mi segunda casa, la oportunidad invaluable que brindan para que los estudiantes podamos tener una formación de posgrado de primer nivel. Muchas Gracias!



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
3.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER	9
3.2. CÁNCER COLORRECTAL	11
3.2.1. INCIDENCIA	11
3.2.2. FACTORES DIETÉTICOS	12
3.2.3. DIAGNÓSTICO	15
3.2.4. TUMORIGÉNESIS	15
3.3. GENERALIDADES DE ONCOGENES Y SUPRESORES TUMORALES	17
3.4. PARTICIPACIÓN DE PROTO-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES EN LAS CASCADAS INTRACELULARES DE SEÑALIZACIÓN.	21
3.5. FAMILIA DE GENES <i>ras</i>	28
3.6. CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES <i>ras</i>	28
3.6.1. LOCALIZACIÓN CELULAR Y TISULAR	29
3.6.2. ESTRUCTURA PROTEÍNICA	29
3.6.3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS PROTEÍNAS RAS	32
3.6.4. FOSFORILACIÓN DE RAS	34
3.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DE RAS	34
3.7.1. FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA	34
3.7.2. REGULACIÓN DE p21 <sup>ras</sup> POR GAPs	35
3.8. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	36
3.9. MUTACIONES ONCOGÉNICAS	37
3.9.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE INCIDENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES <i>ras</i>	37
3.10. MUTACIONES DE LOS GENES <i>ras</i> EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER	39
3.10.1. MUTACIONES DE K- <i>ras</i> EN CÁNCER COLORRECTAL	40
3.11. CORRELACIÓN DE LAS MUTACIONES DE K- <i>ras</i> CON LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES	40
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>42</b>

<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>44</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>48</b>
7.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES Y ESPECÍMENES TUMORALES	49
7.2. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO	49
7.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>ras</i> POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA), A PARTIR DEL DNA GENÓMICO	50
7.4. PATRONES EN FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE RESTRICCIÓN (P C R-R F L P)	52
7.5. POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENAS SENCILLAS ( P C R-S S C P)	53
7.6. ANÁLISIS DE MUTACIONES POR SECUENCIACIÓN	54
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>85</b>
<b>SIGLAS</b>	<b>98</b>
<b>APÉNDICE A</b> SOLUCIONES	<b>100</b>
<b>APÉNDICE B</b> ARTÍCULO	<b>103</b>

## 1. RESUMEN

El gen *K-ras* es un miembro de la familia de genes *ras*, cuyos productos proteínicos, que se encuentran anclados a la membrana celular, funcionan como GTPasas que participan en las vías de transducción de señales de la membrana celular al núcleo. Existen diversos trabajos en la literatura científica en donde se ha observado el patrón de mutaciones de varios genes en diferentes tipos de cáncer. Entre estos trabajos se encuentra la caracterización de mutaciones del gen *K-ras* en tumores colorrectales. Se ha publicado que existe una alta frecuencia de mutaciones del gen *K-ras* en tumores colorrectales. En México se ha observado un incremento importante en la incidencia de cáncer colorrectal en los últimos años. Sin embargo, a la fecha se desconoce el patrón de mutaciones del gen *K-ras* en la población mexicana.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las mutaciones presentes en los codones 12, 13 y 61 del gen *K-ras* en un grupo de tumores colorrectales de pacientes mexicanos.

Utilizando la técnica de PCR-RFLP se identificaron las muestras que presentaban mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 y por medio de PCR-SSCP se identificaron las muestras con mutaciones en el codón 61 del mismo gen. Posteriormente se realizó el análisis por secuenciación para identificar el tipo de mutaciones presentes en tales muestras.

Los resultados indicaron que el 25% (10/40) de los tumores presentaron mutaciones en el codón 12, el 5% (2/40) presentó mutaciones en el codón 13 y el 2.5% (1/40) presentó mutaciones en el codón 61 del gen *K-ras*. El resto de los tumores no presentó mutaciones en ninguno de estos codones. En cuanto al análisis de las secuencias se encontró que el 50% de las mutaciones en el codón 12 correspondieron a cambios de glicina por aspártico (Gly-Asp). Por otra parte, se encontró un mayor porcentaje de transiciones (77%) que de transversiones (23%) dentro de las mutaciones caracterizadas para los tres codones estudiados del gen *K-ras*.

Posteriormente se realizó la correlación de las mutaciones con los datos clínicos de los pacientes. Se encontró que el 60% (6/10) de los tumores con mutaciones en el codón 12 del K-ras presentaron un estadio de Dukes B; por otra parte, el 100% (2/2) de los tumores con mutaciones en el codón 13 presentó un estadio Dukes C. Únicamente se encontró una muestra, clasificada como Dukes C, con una mutación en el codón 61.

Estos resultados indican que en la población analizada de pacientes con cáncer colorrectal, presenta un patrón de mutaciones del gen K-ras dentro del rango que se ha reportado para otras poblaciones del mundo y nos permite sugerir que eventualmente, el gen K-ras podría ser utilizado como un marcador pronóstico para esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una condición que se caracteriza por una proliferación y diferenciación anormal de células y frecuentemente se asocia con la acumulación de alteraciones genéticas en un proceso de desarrollo que puede tomar años o décadas. La activación de ciertos oncogenes por mutaciones puntuales, rearrreglos o amplificación de los genes, inactivación de supresores tumorales por mutaciones puntuales o pérdidas cromosómicas y cambios en el contenido del DNA, son las características genéticas que usualmente se encuentran en las células malignas (Khine, 1994).

La sobrevivencia de pacientes con cáncer colorrectal no ha sufrido grandes cambios en los últimos años. Aunque han habido considerables avances en el desarrollo de técnicas quirúrgicas que permiten la resección de algunos tumores primarios, estas técnicas en muchos casos no son suficientes, ya que hay pacientes que presentan recurrencia en el desarrollo de tumores colorrectales, frecuentemente acompañados de metástasis distantes (principalmente a hígado, intestino delgado, huesos, etc). A los pacientes que son candidatos adecuados, se les trata con quimio y radioterapia adyacente a la resección, pero en algunos casos aún estas terapias no impiden la formación de nuevos tumores que llevarán al paciente a la muerte.

Los estudios sistemáticos que se han realizado acerca de oncogenes y su expresión en tejidos tumorales humanos, así como la expresión de sus respectivas contrapartes normales, son de gran interés, ya que podrían revelar cierta correlación entre los datos moleculares y las propiedades biológicas e histopatológicas de los tejidos y el curso clínico de la enfermedad (Monnat, 1987).

Un evento básico en la cascada patofisiológica llamada carcinogénesis es la alteración en la regulación de los genes celulares responsables del control de la proliferación y diferenciación celular. La velocidad y severidad de este proceso depende de varios factores, incluyendo los mecanismos de reparación del DNA y el sistema inmunológico del individuo. Sin embargo, esta

acumulación de mutaciones somáticas en genes específicos que proveen a la célula la capacidad de proliferar desreguladamente es, en general, la que lleva a la cascada de eventos tumorigénicos. En el modelo genético de tumorigénesis colorrectal se ha postulado que la acumulación de las alteraciones somáticas en genes asociados a los tumores (como proto-oncogenes o genes supresores tumorales), más que el orden en el que estas alteraciones ocurren, es lo que da la pauta para que se desarrolle un tumor maligno (Fearon, 1990).

A lo largo de diversos estudios se ha evaluado la probabilidad de utilizar diferentes genes como marcadores tumorales, para poder predecir el curso clínico de las enfermedades neoplásicas; desafortunadamente en la práctica aún no se ha logrado demostrar claramente la utilidad de algún marcador (Sikora, 1987; Urosevic, 1993).

La transformación de la célula de un estado normal a un estado neoplásico es debida a la acción de oncogenes activados acoplada a la inactivación de genes que actúan como supresores tumorales. Entre los genes involucrados en la tumorigénesis colorrectal, se encuentra el oncogén *K-ras*, un miembro de la familia de genes *ras* que desempeña un papel importante en el metabolismo normal de la célula.

El mecanismo por el cual el deterioro de los genes *ras* y sus productos afecta el programa de proliferación y diferenciación celular aún no es claro. Por esta razón es importante que se lleven a cabo los estudios de tipo molecular, para poder entender de una mejor manera estos procesos y así, poder desarrollar terapias tanto preventivas como curativas para el tratamiento de esta enfermedad.



### 3. ANTECEDENTES

### 3. 1. GENERALIDADES ACERCA DEL CÁNCER

En la actualidad, las etapas del desarrollo del cáncer ya no son un misterio como lo eran a principios de siglo. Durante las dos últimas décadas, se han logrado avances sorprendentes en cuanto a la identificación de los procesos básicos del cáncer a nivel molecular. La importancia de estos descubrimientos radica en el avance que se ha logrado para que los futuros investigadores puedan partir de una mejor base, y se tenga la posibilidad de diseñar tratamientos novedosos y más efectivos para combatir esta enfermedad.

En realidad se utiliza el término "cáncer" para referirse a más de cien formas de este padecimiento. Casi todos los tejidos del cuerpo pueden desarrollar cierto grado de malignidad; sin embargo, hay tejidos que pueden presentar diferentes tipos de malignidad. De hecho, cada tipo de cáncer es único en cuanto a las características que presenta. A pesar de esto, se piensa que muchos de los procesos básicos que producen los diferentes tumores son similares.

Los treinta trillones de células que existen en un cuerpo sano y normal, viven en un microambiente complejo e interdependiente dentro del cual existe una regulación recíproca de la proliferación entre las mismas células. Ciertamente, las células sólo se reproducen cuando las demás a su alrededor lo permiten. De esta manera se asegura que cada tejido mantenga el tamaño adecuado y la forma correcta para sus funciones y las necesidades del organismo.

En contraste, las células tumorales violan este principio, ya que no obedecen las señales comunes que regulan la proliferación y siguen su propio programa de reproducción. Además poseen, en ocasiones, la característica de migrar del sitio de donde surgieron, invadir tejidos vecinos y formar masas tumorales en sitios distantes. Con el paso del tiempo, este tipo de células malignas adquieren mayor agresividad y se tornan letales cuando afectan tejidos u órganos vitales para la supervivencia del organismo.

Actualmente se conoce que las células de un tumor provienen de una célula ancestral común que en un momento, generalmente tiempo antes de que el tumor sea palpable, inició un programa de reproducción inapropiado. La transformación maligna de una célula se produce mediante la acumulación de mutaciones en genes específicos. Estos genes son la clave para entender a fondo el cáncer humano.

Los genes se encuentran en la molécula de DNA, en los cromosomas, dentro del núcleo celular. Especifican las secuencias de aminoácidos que, después de ciertas transformaciones, formarán una proteína particular; esta proteína finalmente realizará alguna función específica dentro de la célula. Cuando un gen se activa, la célula responde sintetizando la proteína para la que ese gen codifica. Las mutaciones en los genes pueden alterar a la célula, ya sea por cambios en la cantidad o en la funcionalidad de la proteína producto.

Existen dos clases de genes que desempeñan un papel fundamental en relación al cáncer, los proto-oncogenes y los genes supresores tumorales. Los primeros actúan promoviendo la proliferación celular, mientras que los últimos inhiben este crecimiento.

Cuando sufren alguna alteración, los proto-oncogenes se pueden transformar en oncogenes. Estas mutaciones pueden causar que el oncogén produzca grandes cantidades o formas super-activas de proteínas que estimulen la proliferación celular. Por el contrario, los genes supresores tumorales contribuyen al proceso carcinogénico cuando sufren mutaciones que los desactivan. El resultado de esta pérdida de funcionalidad como proteína supresora, priva a la célula de los procesos cruciales para evitar la proliferación inapropiada.

Para que un tumor se desarrolle, se requiere que ocurran mutaciones en varios de los genes que son fundamentales para el control adecuado de la proliferación celular. Algunos otros genes de diferente clase participan en la

malignidad al capacitar a la célula proliferante a ser invasiva o capaz de expandirse por otros sitios del cuerpo (metástasis).

### 3. 2. CÁNCER COLORRECTAL

#### 3.2.1. INCIDENCIA

En Estados Unidos, el cáncer colorrectal es una de las neoplasias humanas más comunes, con aproximadamente 149,000 casos nuevos diagnosticados por año. Aproximadamente la mitad de estos pacientes mueren finalmente a causa de la enfermedad. Por lo tanto, el cáncer colorrectal persiste como un problema de salud pública tanto en Estados Unidos (Mastromarino, 1994) como en otros países industrializados. Tal es el caso de Alemania, en donde este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar de incidencia en mujeres y el tercer lugar en hombres (Kampman, 1994); en Holanda, se presentan cada año 48 casos nuevos por cada 100,000 hombres y 49 casos por cada 100,000 mujeres (Kampman, 1994).

A pesar de que los países industrializados presentan una mayor incidencia de casos con cáncer colorrectal, actualmente existe un aumento en la incidencia de este padecimiento en los llamados países en vías de desarrollo. Tal es el caso de nuestro país, en donde la incidencia de cáncer de colon y recto ha aumentado en los últimos años. A finales de los setentas este padecimiento ocupaba el décimo cuarto lugar de incidencia en cáncer en México; sin embargo, a finales de los ochentas ocupaba el cuarto lugar (datos proporcionados por la Secretaría de Salubridad SSA; Segura, 1995; Mendoza-Rodríguez, 1996).

### 3.2.2. FACTORES DIETÉTICOS

Los estudios realizados con un enfoque epidemiológico sobre cáncer colorrectal continúan apoyando la importancia del papel que desempeñan los factores dietéticos en la carcinogénesis colorrectal. En poblaciones cuya dieta es de alto contenido en fibras y bajo contenido en lípidos o grasas, se ha observado una disminución en la incidencia de cáncer colorrectal. En contraste, en países donde existe un alto consumo de grasas y carnes rojas y un bajo consumo de vegetales y fibra, se ha observado un aumento cada vez mayor en la incidencia de este tipo de cáncer, además del de estómago. El exceso de grasas saturadas (grasas animales), contenido en las dietas occidentales, se ha asociado fuertemente al incremento de cáncer colorrectal. Existen diversas hipótesis que proponen alguna relación entre el consumo de grasas y el desarrollo de cáncer. Una de ellas sugiere que las grasas *per se* no son el problema, si no el exceso de ácidos grasos contenidos en el colon que no han entrado a la circulación enterohepática, combinados con la secreción de ácidos biliares, en el proceso de digestión. Diversas líneas de investigación sugieren que los ácidos grasos y los ácidos biliares pueden estimular la división celular en el colon, además de tener algunos otros efectos fisiológicos y biológicos. Otra de las hipótesis sugiere que cierto tipo de ácidos grasos y triglicéridos pueden estimular la división celular al interrumpir la comunicación intercelular, dando como resultado una señal inapropiada para que las células del colon continúen replicándose (Wargovich, 1994).

Existen otros factores de riesgo como la ingesta excesiva de carnes rojas. Cuando las proteínas de la carne se exponen a altas temperaturas (al freírse o al asarse al carbón), los aminoácidos se ciclizan, dando origen a compuestos del tipo aminas heterocíclicas, que ahora se conoce que son extremadamente mutagénicos (Wargovich, 1994). Existen factores dietéticos como el calcio, y más específicamente el fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), que se presume que forma compuestos saponificados insolubles con los ácidos grasos y los ácidos

biliares y de esta manera, reduce la dosis tóxica efectiva a las células epiteliales del colon y la subsecuente respuesta proliferativa. El calcio también podría influenciar directamente la proliferación celular al inducir diferenciación celular (Newmark, 1992; Kampman, 1994). También se ha propuesto que algunos productos fermentados como son yogurt y queso, y además la mantequilla, poseen un efecto protector ya que se cree que la presencia de lactobacilos en el tracto gastrointestinal, contribuye a la estabilización de la flora intestinal y proporciona efectos benéficos al hospedero al contribuir con el consumo diario de calcio (Kampman, 1994). Se han descrito algunos otros factores como la vitamina A, la vitamina C (Georgiannos, 1993; Henson, 1991), la vitamina E (Wargovich, 1994), el selenio y algunos otros recientemente identificados, que también pueden ejercer un efecto de protección celular en contra del daño en las células epiteliales del colon. Estos compuestos se encuentran en algunos alimentos que deben incluirse en la dieta diaria (Tabla 3.1) (Wargovich, 1994).

En la tabla 3.2 se muestran algunas recomendaciones actuales acerca de la dieta, formuladas por el NCI (National Cancer Institute) y otros centros de investigación sobre cáncer. Una de las recomendaciones mas importantes es el consumo mínimo de 5 y hasta 8 raciones de frutas y verduras por día, ya que en estos alimentos se han encontrado algunos de los compuestos que protegen contra el cáncer (Wargovich, 1994).

**Tabla 3.1. Anticancerígenos identificados contenidos en diferentes alimentos**

COMPUESTO	FUENTE ALIMENTICIA	EFFECTOS DE PREVENCIÓN EN MODELOS ANIMALES
Curcumina	Tumérico	Cáncer de colon
Sulfuro de dialilo	Ajo	Cáncer de colon
Ácido elágico	Fresas	Cáncer de colon
Epigallocatequinas	Te verde japonés	Cáncer de colon
Ácido glucárico	Crucíferas (lechuga, coliflor, rábano)	Cáncer de colon
Ácido glicirretínico	Raíz de regaliz	Cáncer de piel
Limoneno	Limonos	Cáncer de estómago
Quercetina	Cebollas	Cáncer de colon
S-alil cisteína	Ajo	Cáncer de colon

**Tabla 3.2. Recomendaciones dietéticas para la prevención del cáncer de colon\***

Alimentos recomendados		Alimentos de consumo moderado		
Frutas y vegetales	Fibra	Grasas	Alcohol	Sal
Consumir por lo menos 5 porciones al día	Aumentar el consumo a 30g por día	Reducir la ingesta al 30% de calorías diarias	Consumo moderado o evitar el consumo por completo	Consumo moderado; evitar alimentos muy salados

\*Adaptación del Surgeon General's Report on Nutrition and Health, Public Health Service, 1988.

### 3.2.3. DIAGNÓSTICO

Actualmente, los programas de detección de carcinomas colorrectales se basan en la búsqueda de sangre oculta en heces fecales, además de la exploración física rutinaria y la protosigmoidoscopia flexible. Desafortunadamente muchos pacientes no se someten a los exámenes de rutina y aún a los pacientes que se examinan, se les diagnostica la enfermedad en etapas relativamente avanzadas de ésta (Mastromarino, 1994). La clasificación histopatológica preoperatoria es crucial para planear el tratamiento quirúrgico o no quirúrgico de los pacientes con carcinoma colorrectal. Es por esto que la colonoscopia se utiliza para el diagnóstico y para valorar además la presencia de pólipos y carcinomas (Roubein, 1994). Sin embargo, sería ideal contar con marcadores tumorales de tipo molecular que indicaran desde el riesgo del paciente, hasta el pronóstico y diagnóstico del mismo de manera más eficaz. Actualmente diversos grupos exploran esta opción, estudiando las mutaciones y la expresión de diversos oncogenes, como *K-ras* y *p53* entre otros, tanto en tejido tumoral como en tejido normal, para conocer y predecir el curso de la enfermedad y del paciente (Hackford, 1993; Minamoto, 1995; Zhu, 1997).

### 3.2.4. TUMORIGÉNESIS

El modelo propuesto por Fearon y Vogelstein (Cell, 1990) y retomado por Gallick (The Cancer Bulletin, 1994), describe algunas de las alteraciones genéticas que ocurren en las células epiteliales del colon durante el desarrollo y la progresión de los pólipos adenomatosos a carcinomas colorrectales malignos (Fig. 3.1). El entendimiento de los eventos epidemiológicos y genéticos que ocurren durante el desarrollo y la progresión de los tumores colorrectales malignos, es necesario para el desarrollo de mejores programas de detección y prevención del cáncer y el diseño de terapias más efectivas para los pacientes que padecen la enfermedad. Los estudios básicos se



enfocan a diversas moléculas, como las de adhesión a la superficie celular, factores de crecimiento y sus respectivos receptores, vías celulares de transducción de señales y alteraciones (mutaciones o deleciones) en supresores tumorales u oncogenes. La información que se pueda obtener de estos estudios podría ampliar el panorama para entender mejor los mecanismos de esta enfermedad y permitir el desarrollo de mejores pruebas de diagnóstico, marcadores de pronóstico y tratamientos con una mayor efectividad.

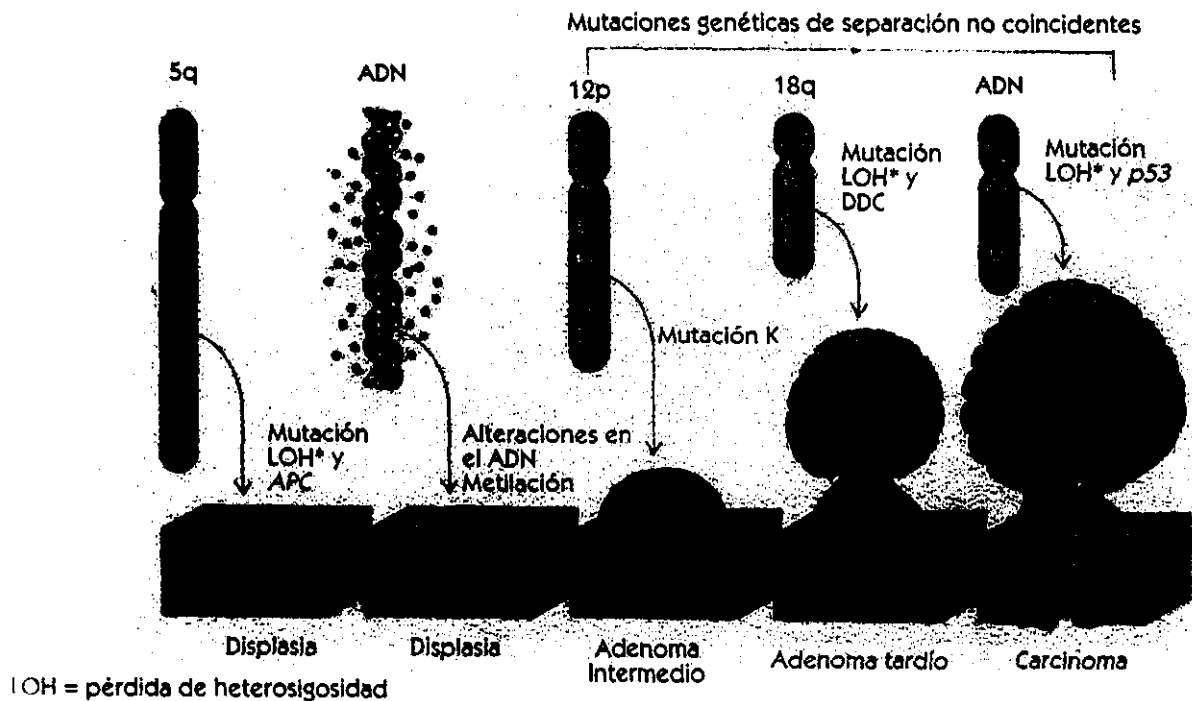


Fig. 3.1. Modelo del desarrollo de la tumorigénesis colorrectal en etapas múltiples. 5q: brazo largo del cromosoma 5, donde se encuentra el supresor tumoral *apc* (adenomatous poliposis coli); 12p: brazo corto del cromosoma 12, donde se localiza el gen *K-ras*; LOH: pérdida de heterocigosidad; 18q: brazo largo del cromosoma 18, donde se encuentra el supresor tumoral *dcc* (deleted in colorectal cancer) (tomado de Salcedo, 1998).

### 3.3. GENERALIDADES DE ONCOGENES Y SUPRESORES TUMORALES

Las células cancerosas contienen diversas alteraciones genéticas que se acumulan gradualmente durante el proceso de la progresión tumoral. A pesar de que el orden y la naturaleza de aparición de estas alteraciones no se conoce del todo para ningún tipo de neoplasia, se considera que la acumulación de éstas es crucial para la expresión del fenotipo transformado (Lafrancone, 1994).

Durante los últimos 20 años, se han reunido evidencias experimentales que implican ciertos *loci* involucrados fisiológicamente en la regulación de la proliferación celular, como causantes de los defectos genéticos de las células neoplásicas. Los "genes del cáncer" se han dividido, en base a su actividad bioquímica y biomolecular (cuando se conoce) y al tipo de alteración genética que afecta a la célula neoplásica, en dos grupos: proto-oncogenes y genes supresores tumorales.

Los proto-oncogenes codifican para proteínas que participan en las vías de señalización celular. Estas vías son estimuladas por factores de proliferación, como hormonas, receptores a hormonas, proteínas citoplásmicas transductoras de señales y factores nucleares. Las alteraciones en los proto-oncogenes, como mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas y amplificación de genes, modifican la función normal de las proteínas, lo que en muchas ocasiones provocan que exista una aceleración en la división celular. Ya que los alelos mutantes de los proto-oncogenes son capaces de transformar células a pesar de la expresión de los alelos normales, se les clasifica como dominantes. Por otra parte, aunque se entiende menos su función, se encuentran los genes supresores tumorales; éstos también codifican proteínas que son componentes fisiológicos de las vías de señalización celular (como receptores, proteínas citoplásmicas transductoras de señales y factores nucleares), que inhiben la proliferación celular, deteniendo la progresión a través del ciclo celular, bloqueando la

diferenciación o induciendo envejecimiento y muerte celular. Como se esperaría, las alteraciones genéticas en los genes supresores tumorales (mutaciones puntuales o deleciones) llevan a una pérdida de función y se consideran como recesivos a nivel celular (Bishop, 1994; Lanfrancone, 1994). En la actualidad se sabe que la expresión anormal de ciertos oncogenes es, en gran parte, responsable de la producción de un fenotipo maligno, de la subsecuente invasión y posteriormente, cuando es el caso, de las metástasis. En los últimos años, se han logrado identificar más de cien oncogenes y supresores tumorales y algunos se han asociado particularmente con ciertos tipos de cáncer (Tabla 3.3).

Como ya se mencionó anteriormente, muchas de las proteínas que son codificadas por proto-oncogenes se encuentran participando en las vías de transducción de señales. Estas vías son el mecanismo mediante el cual el estímulo de proliferación llega de la membrana celular al núcleo. Existen dos reglas principales que rigen estas rutas de señalización. Primero, las señales pasan de los receptores de la superficie celular, a una enzima unida a la membrana que actúa como amplificadora de la señal, vía una molécula transductora. Segundo, la enzima amplificadora, utilizando enzimas adicionales como segundos mensajeros y cascadas de fosforilación, dispara cambios en el entorno citoplasmático, de manera que la señal emitida llega al núcleo (Hackford, 1993). Estos oncogenes y supresores tumorales se han clasificado de acuerdo a su función normal dentro de la célula (Tabla 3.4; Hesketh, 1995).

**Tabla 3.3. Oncogenes y supresores tumorales asociados a ciertos tipos de cáncer humano (Hesketh, 1995).**

<b>Genes afectados</b>	<b>Tipo de tumor</b>
<i>apc, mcc, dcc, p53, K-ras</i>	Carcinoma colorrectal
<i>H-ras, myc</i>	Carcinoma cervical
<i>myb, myc, egfr, her2, H-ras, p53, rb1, brca1, bcl1, hstf1, int2</i>	Carcinoma de mama
<i>jun, myc, myc-N, myc-L, H-ras, rb1, p53, raf1</i>	Carcinoma de pulmón
<i>H-ras, p53, raf1, int2</i>	Carcinoma de células escamosas
<i>myc, blym</i>	Linfoma de Burkitt
<i>p53, egfr, myc, myc-N, gli, her2, pdgf-B, ros, tgf-<math>\alpha</math></i>	Astrocitoma
<i>abl</i>	Leucemia mieloide crónica

**Tabla 3.4. Clasificación funcional de ciertos productos de oncogenes**

<p>Clase 1. Proteínas relacionadas a factores de crecimiento:                  PDGFB/Sis, INT2, HSTF1/HST1</p>
<p>Clase 2. Tirosina-quinasas:                  Tirosina-quinasas tipo receptores:                  EPH, EGFR/ERBB, FMS, KIT, MET, HER2/NEU, TRK                  Tirosina-quinasas no receptores:                  ABL, FPS/FES                  Tirosina-quinasas no receptores, asociadas a membrana:                  SRC, FGR, FYN, HCK, LCK, YES</p>
<p>Clase 3. Receptores sin actividad de proteína cinasa:                  MAS</p>
<p>Clase 4. Proteínas G asociadas a membrana:                  HRAS, KRAS2, NRAS, GSP, GIP2</p>
<p>Clase 5. Serina-quinasas citoplásmicas:                  BCR, MOS, PIM1, RAF/MIL</p>
<p>Clase 6. Serina, treonina y tirosina cinasas:                  STY</p>
<p>Clase 7. Reguladores citoplásmicos:                  CRK, BCL1, ornitina descarboxilasa, PEM, NCK</p>
<p>Clase 8. Proteínas de unión a DNA (factores de transcripción)                  o proteínas localizadas preferentemente en el núcleo :                  FOS, JUN, ETS, MYC, MYB, REL, ERBA, P53, BCL3, CBL, TAL1, SKI</p>
<p>Clase 9. Factores de membrana mitocondrial:                  BCL2</p>
<p>Clase 10. Función desconocida:                  LCO , AKT, DLK, MEL, SCC, TLM</p>

### 3. 4. PARTICIPACIÓN DE PROTO-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES EN LAS CASCADAS INTRACELULARES DE SEÑALIZACIÓN.

Como ya se mencionó anteriormente, muchos de los proto-oncogenes que se conocen codifican para proteínas que se encuentran en la membrana celular; la función de estas proteínas es transmitir señales de proliferación, del exterior al interior de la célula. La desregulación en la proliferación celular surge cuando ciertas mutaciones en algunos de estos proto-oncogenes producen un aumento en la actividad de una vía importante de estimulación de la proliferación, cuando ésta debería permanecer inactiva. Un ejemplo muy claro lo tenemos en la cascada de transducción de señales donde participan las MAPKs (siglas en inglés de Mitogen-Activated Protein Kinases; en español Cinasas de las Proteínas Activadas por Mitógenos) (Cano, 1995). En este tipo de vías, una variedad de estímulos del exterior de la célula activan a receptores que poseen actividad intrínseca de tirosinas cinasas (RTKs; siglas en inglés de Receptor Tyrosine Kinases, en español Tirosina-cinasa tipo receptor), como los receptores a EGF (del inglés Epidermal Growth Factor; en español, Factor de Crecimiento Epidérmico), PDGF (del inglés Platelet Derived Growth Factor; en español, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), NGF (del inglés Neural Growth factor; en español, Factor de Crecimiento Neural), insulina, y otros, además de diversos receptores de células inmunes (TCR (del inglés T-Cell Receptor; en español Receptor de Células T), BCR (del inglés B-Cell Receptor; en español Receptor de Células B); IgGR's (del inglés Immunoglobulin-G Receptor; en español Receptor de Inmunoglobulinas G), etc.). Estos estímulos disparan una señal para la proliferación celular que se transmite de los receptores de factores de crecimiento, a las proteínas de unión a receptores, como la Grb-2 (del inglés Growth Factor Receptor-Bound Protein 2; en español Proteína 2 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento).

Grb-2 se aisló como una proteína que contenía el dominio SH2 (Src Homology 2) y que se asociaba al receptor del EGF; pesa aproximadamente 23 kDa y el dominio SH2 que contiene está flanqueado por dos dominios SH3 (Src Homology 3). Los dominios SH2 se unen específicamente a proteínas que contienen tirosinas fosforiladas en su secuencia, y los dominios SH3 se unen a proteínas con dominios ricos en prolina. Varias de estas secuencias se encuentran presentes en la proteína Sos (del inglés Son of Sevenless; en español no hay traducción) (Chang, 1994). La proteína Grb-2 actúa como adaptador, facilitando la asociación de Sos con los receptores tirosina-cinasa. Grb-2 se une tanto al receptor activado (por ejemplo al receptor del EGF) como a Sos por medio de su dominio SH3 (Boguski, 1993). Aunque el mecanismo de interacción de Sos con las proteínas Ras se desconoce, se sabe que esta proteína activa a Ras en la cascada de señales, actuando como factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GNEF, del inglés Guanine Nucleotide Exchange Factor) estimulando el intercambio de  $p21^{ras}$ -GDP por GTP (Pronk, 1994).

Existe otra vía alternativa para la activación de Ras por EGF o también por tirosina-cinasas que no son receptores. En ésta participa la proteína adaptadora Shc. Esta proteína contiene un dominio SH2 además de una secuencia rica en glicina/prolina, por lo que se puede unir al receptor de EGF y ser fosforilada en residuos de tirosina cuando el receptor de EGF está activado. Como consecuencia de esta activación, Grb-2 se asocia a Shc fosforilado. De esta manera, la asociación del receptor de EFG con Grb2 y Sos puede medirse (por lo menos en parte) por Shc, permitiendo una vía alternativa para recluir al complejo Grb2-Sos a la membrana celular (Maruta, 1994). Existen diversas evidencias que indican que Shc participa en la cascada de señalización de  $p21^{ras}$ , en la regulación de esta proteína por receptores tirosina-cinasas de factores de crecimiento y tirosina-cinasas que no son receptores (Boguski, 1993; Pronk, 1994).

Posteriormente participan proteínas activadoras de la GTPasa de Ras (GAPs, del inglés GTPase Activating Proteins), como p120<sup>GAP</sup>. Se considera que p120<sup>GAP</sup> es un excelente candidato para el papel de la regulación de la actividad de p21<sup>ras</sup>. Se ha identificado como una proteína citosólica que es capaz de estimular hasta cien veces la hidrólisis de GTP cuando está unido a p21<sup>ras</sup> (McCormick, 1989). De este modo, p21<sup>ras</sup> puede regresar a su estado inicial inactivo, unido a GDP (McCormick, 1994a). p120<sup>GAP</sup> posee diversos dominios funcionales. El primero, que es el dominio necesario para la interacción con p21<sup>ras</sup>, es capaz por sí mismo de estimular la actividad GTPasa de p21<sup>ras</sup>, aunque la proteína completa es más eficaz. p120<sup>GAP</sup> contiene también un dominio SH3 flanqueado por dos dominios SH2. La presencia de los dominios SH2, sugiere la interacción con proteínas que poseen residuos de tirosina fosforilados; de hecho, p120<sup>GAP</sup> es capaz de asociarse a cierto tipo de receptores de factores de crecimiento activados que poseen actividad de tirosina-cinasas, así como a algunas proteínas con actividad de tirosina-cinasa que no son receptores (Pronk, 1994). Además de una región amino terminal hidrofóbica, dos dominios SH2 y un dominio SH3, esta proteína contiene un dominio PH (Pleckstrin Homology) y una región similar a la región Ca1B de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esto último indica que, bajo ciertas circunstancias, se lleva a cabo una translocación dependiente de calcio a la membrana celular (Boguski, 1993).

Otra proteína que regula a p21<sup>ras</sup> es la Neurofibromina (NF1). Esta proteína posee una región homóloga al dominio catalítico de p120<sup>GAP</sup> y puede estimular la actividad de GTPasa de p21<sup>ras</sup> (Pronk, 1994; Bernardis, 1995).

Con respecto a los efectores corriente abajo de p21<sup>ras</sup> se encuentra la cinasa Raf. Esta cinasa es una proteína importante en la transducción de señales desde Ras hasta las MAP cinasas (Prendergast, 1994). Diversos grupos han reportado que Ras y Raf cinasa (Ras/Raf) se encuentran como un complejo común y que existe una interacción bioquímica directa entre ellos. La



importancia de la participación de Ras/Raf en las cascadas de señalización es crítica para que se dé la respuesta inducida por factores de crecimiento en una gran variedad de tipos celulares (Yamauchi, 1994).

El oncogen *c-raf* es el homólogo celular del oncogen viral *v-raf*. Los miembros de la familia Raf contienen tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. La región CR1 contiene un motivo de dedos de zinc; CR2 contiene varios residuos de serina y treonina capaces de ser fosforilados y CR3 es el dominio de cinasa (Burgering, 1995). Las mutantes oncogénicas de este gen son capaces de transformar líneas celulares establecidas. La proteína Raf1 es fosforilada en varios residuos de serina y, bajo ciertas circunstancias, en residuos de tirosinas, después del estímulo de los factores de crecimiento.

Se ha encontrado que el extremo amino terminal de Raf1 está involucrado en la interacción con  $p21^{ras}$ -GTP. Esta región contiene un dominio de unión asociado a zinc y se ha demostrado que la presencia de zinc es fundamental para esta interacción. Sin embargo, se ha observado que la interacción de Raf1- $p21^{ras}$ -GTP no es suficiente para la activación de Raf1 *in vitro*, por lo que debe existir otra señal que active por completo a Raf1. A la fecha se conocen solamente dos proteínas cinasas que activan la actividad cinasa de Raf1: c-Mos y PKC. La acción de c-Mos es dependiente de Ras, mientras que la acción de PKC es independiente de Ras (Maruta, 1994). Se ha reportado que la proteína fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC) actúa después de  $p21^{ras}$  y antes de Raf1 en la cascada de señalización celular, por lo que la participación de PC-PLC podría ser en la activación de Raf1, a través de la PKC cinasa (Burgering, 1995), que se activa por la producción de diacilglicerol (DAG) mediada por PC-PLC (Pronk, 1994).

Ya que el papel de Ras no es el de activar directamente a Raf1, se ha sugerido que la función principal de  $p21^{ras}$ -GTP es colocar a Raf1 en la membrana plasmática en donde puede ser activado (Burgering, 1995). Al parecer,  $p21^{ras}$ -GTP transloca a Raf1 a la membrana plasmática actuando

como catalizador. Una vez anclado en la membrana plasmática, Raf1 se asocia con elementos del citoesqueleto; esta unión desencadena la actividad de una cascada de cinasas que terminan finalmente en las Erks (del inglés Extracellular-signal-regulated Kinases; en español, Cinasas reguladas por señales extracelulares) y una variedad de diversos blancos celulares. Las proteínas Erks (Erk1 y 2) son serina/treonina cinasas, de 40-46 kDa, que se activan en células tratadas con diferentes factores de crecimiento (Chuang, 1994). La activación se da por la fosforilación de dos residuos de treonina y tirosina que se encuentran separados únicamente por un aminoácido. Las proteínas responsables de la fosforilación de las Erks, conocidas como MEK (MAPKK, cinasas de las MAPK), son a su vez, fosforiladas por Raf1 en residuos de serina.

Después de las proteínas Erk, existe una variedad de blancos que pueden ser activados por medio de esta cascada de cinasas. Entre éstos se encuentran algunas treonina/serina cinasas, como p90<sup>rsk</sup>, que *in vitro*, es capaz de fosforilar la proteína ribosomal S6, aunque al parecer *in vivo* el sustrato de p90<sup>rsk</sup> es diferente.

Otros blancos de las Erks son algunos factores que se localizan en el núcleo celular y que participan en la regulación de la transcripción, como por ejemplo c-Fos. En el caso de c-Jun existe controversia acerca del sitio de fosforilación, sin embargo se sabe que también puede ser fosforilada por Erk2 y p90<sup>rsk</sup>. Por otro lado se ha observado que Erk2 también puede fosforilar a c-Myc y a p62<sup>TCF</sup> (Ternary Complex Factor o Factor del Complejo Terciario). p90<sup>rsk</sup> por su parte fosforila al SRF (Serum Response Factor o Factor de Respuesta al Suero).

Actualmente se reconoce a p21<sup>ras</sup> como un importante "switch" en las vías de señalización que conectan a los receptores de la superficie celular a los blancos celulares específicos (Fig. 3.2). Estas vías no necesariamente son arreglos simples de eventos lineales, sino interconexiones complejas de

diversas vías de señales que se entrelazan para que finalmente, se produzca como resultado la regulación de los procesos vitales de la célula como la proliferación, la diferenciación, los procesos metabólicos y la apoptosis. Por esta razón se deben identificar los componentes que participan en estos procesos y tener un indicio para conocer la regulación de las múltiples funciones que la célula realiza durante su periodo de vida.

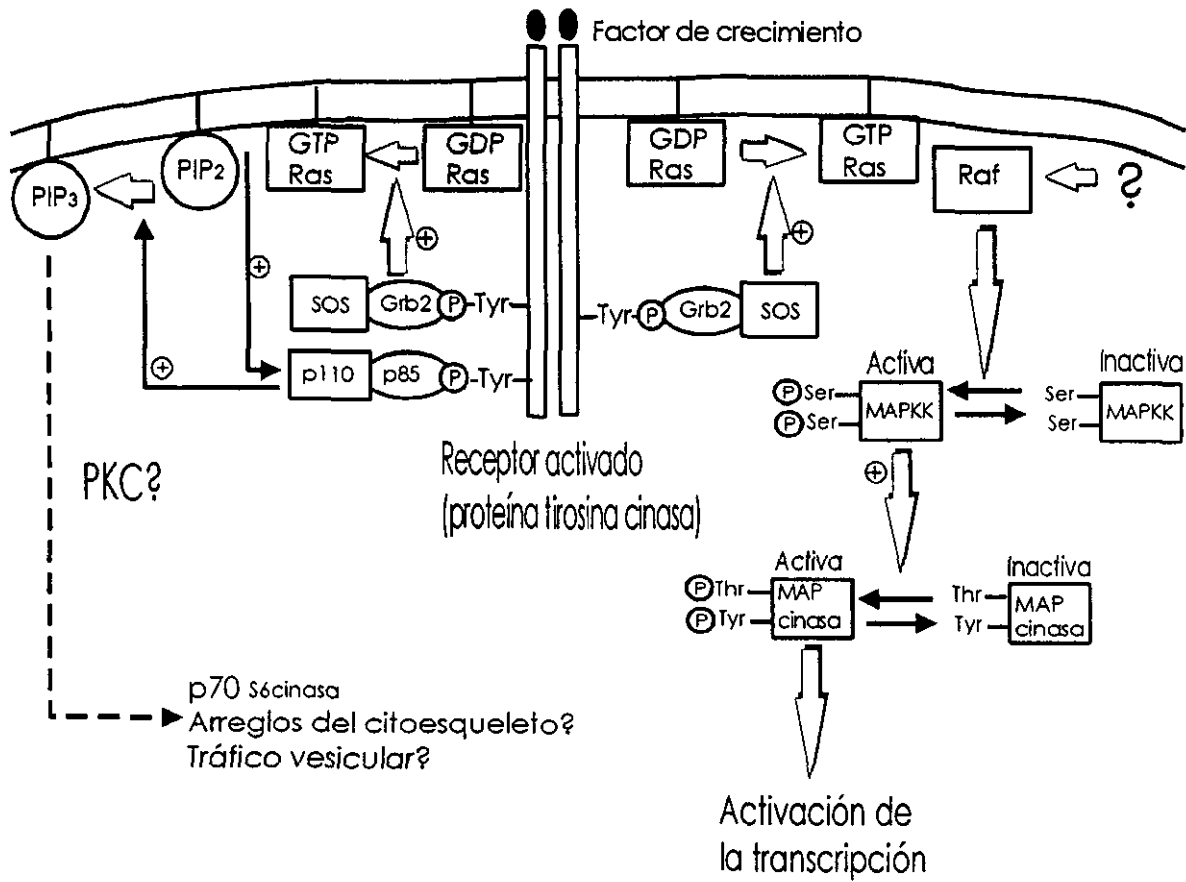


Fig 3.2. Cascada de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo (tomado de Kodaki et al, 1994).

### 3. 5. FAMILIA DE GENES *ras*

La familia *ras* forma un grupo de genes estrechamente relacionados que se encuentran muy conservados. Los genes de la familia *ras* que mas se han estudiado son: H-*ras*, el cual se aisló por primera vez del virus del sarcoma murino de Harvey, K-*ras* del virus del sarcoma murino de Kirstein y N-*ras*, detectado en tumores neuronales de ratón. Se conocen aproximadamente 50 genes relacionados a la superfamilia de genes *ras* dentro de los cuales se incluyen los siguientes: N-*ras* L1, N-*ras* L2 y N-*ras* L3; R-*ras*, *rhoA*, *rhoB* y *rhoC*, *rac-1* y *rac-2*, *ral*, *rap-1A* (también llamado Krev-1) y *rap-1B*, *rap-2*, *rab-2*, *mel*, *let-60*, y otros más (Hesketh, 1995).

Esta familia de genes *ras* codifican para un grupo de proteínas que se unen a nucleótidos de guanina (GTP-binding proteins) conocidas como p21. Estas proteínas están asociadas a la superficie interna de la membrana citoplasmática, poseen actividad intrínseca de GTPasa y están involucradas en el proceso de transducción de señales de la superficie celular al núcleo (Boguski, 1993; Schlessinger, 1993; Avruch, 1994). Se ha demostrado que las mutaciones puntuales en alguna de las primeras dos bases de los codones 12, 13 y 61 de los proto-oncogenes *ras* son responsables de la sustitución de aminoácidos en estas posiciones particulares de las proteínas. Como una consecuencia de estas sustituciones, se inhibe la actividad intrínseca de GTPasa de la proteína, resultando en la alteración de la transmisión de las señales de la membrana plasmática al núcleo celular, que terminan por afectar los procesos de proliferación y diferenciación celular.

### 3. 6. CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES *ras*

En la tabla 3.5 se observan las diferentes características de los genes *ras* que, a la fecha, son los más estudiados: K-*ras*, N-*ras* y H-*ras*. Se muestra la localización de los genes en los cromosomas humanos, así como también el

tamaño del RNA mensajero, el número de residuos y la masa en kilodaltones (kDa) de la proteína.

**Tabla 3.5. Características de ras**

Proteína/gen	Cromosoma	Exones (codificantes)	mRNA (kb)	Residuos (N° aa)	Masa (kDa)
NRAS/N- <i>ras</i>	1p13	4	2.0 / 4.3	189	21
HRAS/H- <i>ras</i>	11p15.5	4	1.1-1.2	189	21
KRAS/K- <i>ras</i>	12p12.1	4	3.8 / 5.5	188 / 189	21

### 3. 6. 1. LOCALIZACIÓN CELULAR Y TISULAR

Las tres diferentes proteínas Ras ( $p21^{ras}$ ) de mamíferos se unen a lípidos y se localizan ancladas en la superficie interna de la membrana plasmática a través de un grupo farnesilo (Hancock, 1993). La localización tisular de las proteínas es ubicua (Hesketh, 1995).

### 3. 6. 2. ESTRUCTURA PROTEÍNICA

La proteína  $p21^{ras}$ , comprende un dominio central de seis estructuras  $\beta$ -plegadas y cinco  $\alpha$ -hélices, dos de las cuales ( $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) se encuentran por debajo del plano definido por la  $\beta$ -plegada. De las diez asas en la proteína, L1 contiene Gly12 (el sitio de mutación más frecuente en tumores humanos), L2 incluye los residuos que probablemente interactúan con el efector y L4 contiene Gln61 (Fig 3.3a). Las estructuras cristalinas concuerdan con un estado transitorio de estabilización para la hidrólisis de GTP por  $p21^{ras}$ , en el que se forma un complejo entre el fosfato- $\gamma$  de GTP y la cadena lateral de Gln61. Cualquier sustituyente en la posición 61 es incapaz de estabilizar el estado de transición; la mutación de alanina por treonina en el residuo 59

altera la posición del Gln61 y se asume que las mutaciones en la posición 12 interfieren con la acción de la cadena lateral de Gln61.

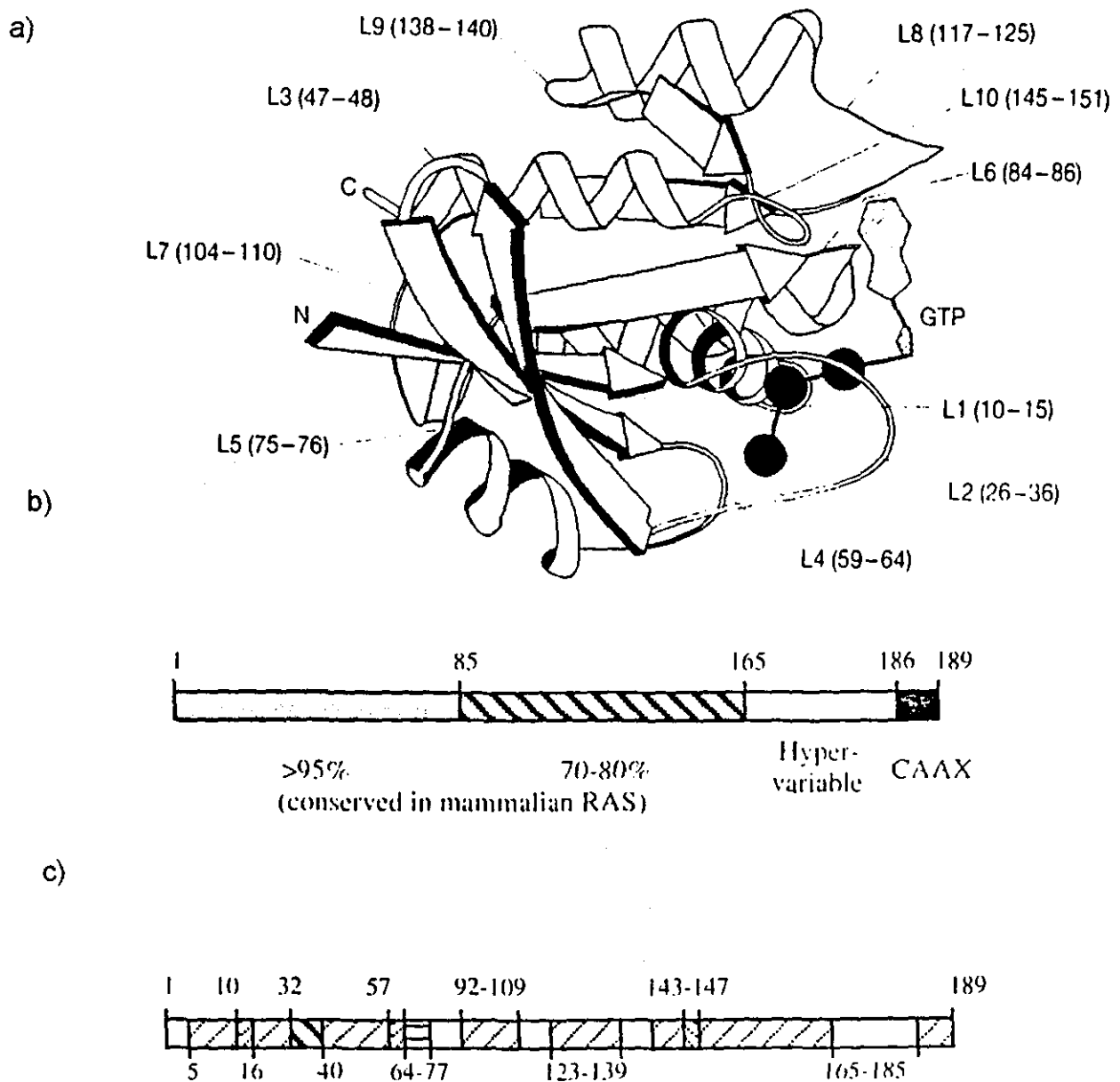


Fig. 3.3. Dominios de las proteínas RAS en donde se muestra a) la estructura de la proteína Ras, b) las regiones conservadas en los mamíferos y c) la funcionalidad de los dominios (ver texto) (Hesketh, 1995).

Los dominios esenciales para la actividad transformante de p21<sup>ras</sup>, a pesar de no ser contiguos, son: el dominio que abarca los residuos del 5-63, el que abarca del 77-92, del 109-123, del 139-165 y por último del 186-189 (Fig. 3.3a y c).

Los dominios de los residuos 10-16, 57-62 y 116-119 son regiones de unión a nucleótidos, altamente conservadas.

Los dominios de los residuos 10-15 y 59-64 forman dos asas adyacentes a los grupos fosfato del nucleótido de guanina enlazado.

Los residuos 116-119 y 145-147 forman parte del "pocket" o bolsa de la base púrica del nucleótido.

El residuo 30 se encuentra en una posición opuesta al azúcar ribosa del nucleótido de guanina enlazado.

El dominio de los residuos 32-40 es el dominio efector. Se ha inferido que este dominio participa en las interacciones de las proteínas p21<sup>ras</sup> con blancos celulares. También es esencial para la estimulación de la actividad GTPasa por GAPs.

El dominio de los residuos 61-65 confiere la sensibilidad p21<sup>ras</sup>-GAP a p21<sup>ras</sup>.

El dominio 68-73 es reconocido por el anticuerpo monoclonal Y13-259.

Aunque no se conoce su función específica, se sabe que el dominio que abarca los residuos 165-184 es bastante divergente.

El dominio 186-189 presenta un motivo CAAX. Éste es indispensable para la asociación de la proteína p21<sup>ras</sup> a la membrana citoplásmica.

Los dominios dispensables de la proteína son los siguientes: 1-5, 63-77, 92-109, 123-139, 165-185.

En cuanto a las alteraciones de *ras*, a la fecha se conoce que las mutaciones puntuales naturales que lo activan ocurren en los residuos 12, 13, 59 y 61.

Se han observado otras mutaciones puntuales, aunque éstas son creadas por mutagénesis *in vitro*, en los codones 63, 116, 117, 119 y 146 (Hesketh, 1995).



### 3. 6. 3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS PROTEÍNAS RAS

Para poder unirse a la membrana celular, las  $p21^{ras}$  deben sufrir alguna modificación postraducciona. Todas las  $p21^{ras}$  se encuentran poliisopreniladas. Esta modificación postraducciona de H-Ras, N-Ras y K-Ras, se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso involucra el motivo CAAX (C=cisteína, A= aa. alifático, X= aa. no alifático que puede ser metionina o serina). La Cys186 es alquilada con un farnesilo  $C_{15}$  por acción de la enzima farnesil-transferasa (FPTasa); los aminoácidos AAX son removidos por proteólisis (AAX proteasa microsomal) y el nuevo grupo carboxilo expuesto (carbono  $\alpha$ ) del la nueva Cys del extremo C-terminal, se metila por la acción de la enzima carboxi-metilasa (Fig 3.4). El producto modificado (c-  $p21^{ras}$ ) es más hidrofóbico que el producto no modificado (pro-  $p21^{ras}$ ) y se asocia débilmente a las membranas celulares. En el segundo paso se requiere de la palmitoilación de los residuos de Cys de la región hipervariable (aa 165-185), adyacente al motivo CAAX. La enzima que lleva a cabo esta modificación es la palmitoil-transferasa (PT). En las proteínas H-Ras, N-Ras y K-Ras(A), esta modificación aumenta la afinidad y la capacidad de unión por la membrana. Las dos modificaciones son necesarias para la localización membranal (Hancock, 1993).

$p21^{Kras(B)}$  no posee Cys en la región hipervariable y por consiguiente, no se lleva a cabo el paso final de palmitoilación; sin embargo, posee una región polibásica (seis lisinas en 175-180) que es esencial para la localización en la membrana plasmática. (Hesketh, 1995)

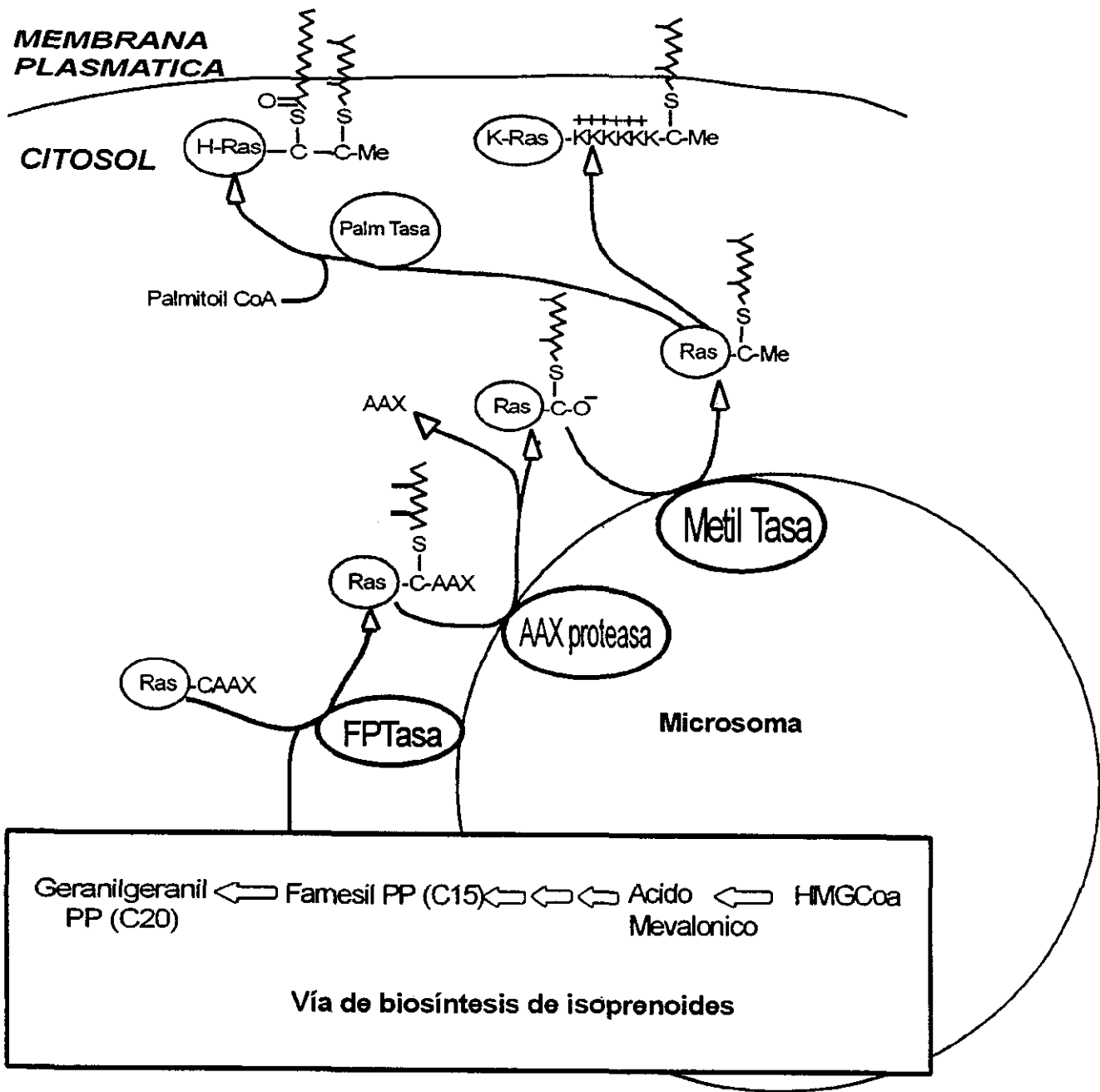


Fig. 3.4. Mecanismo de farnesilación postraduccional de las p21<sup>ras</sup> (Hancock, 1993)

### 3. 6. 4. FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAS

Las proteínas  $p21^{ras}$  son fosforiladas por las proteínas cinasas A o C en la serina 177 que se encuentra en la región hipervariable, uniendo el dominio catalítico globular con el extremo C-terminal de la proteína.

### 3. 7 MECANISMOS DE ACCIÓN DE RAS

#### 3. 7. 1. FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA

Este proceso de intercambio se lleva a cabo en varias etapas. Primero, la proteína de intercambio se une al complejo inactivo  $p21^{ras}$ -GDP . Como consecuencia de la unión, la afinidad de  $p21^{ras}$  por GDP se reduce considerablemente, por lo que GDP se disocia de manera apreciable. En ausencia de nucleótidos de guanina, la forma "vacía " de  $p21^{ras}$  permanece fuertemente asociada al GNEF. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas (es decir, a concentraciones mM de GTP), se presenta una rápida asociación de GTP al complejo GNEF- $p21^{ras}$  "vacío". Esta unión de GTP facilita la disociación del complejo anterior, dejando a  $p21^{ras}$  activo unido a GTP ( $p21^{ras}$ -GTP) (McCormick, 1994a).

Como se había mencionado anteriormente, las proteínas  $p21^{ras}$  son GTP-*asas* que se encuentran unidas a la membrana plasmática. Las  $p21^{ras}$  normalmente hidrolizan GTP a velocidades comparables a las que alcanzan las proteínas G purificadas. Existe un equilibrio en la concentración de las proteínas  $p21^{ras}$  entre la forma activa ( $GTP/p21^{ras}$ ) y la forma inactiva ( $p21^{ras}/GDP$ ). La acción de una variedad de factores de crecimiento incrementa la concentración celular de  $GTP/p21^{ras}$  y el cambio conformacional, inducido por la unión de GTP, activa a  $p21^{ras}$ , permitiéndole interactuar con las moléculas blanco ("efectores") (Hesketh, 1995).

Las proteínas G son inactivas cuando se unen a GDP; en el momento que se separa el GDP de la proteína, ésta adquiere una conformación transitoriamente “vacía”; es decir, no se encuentra unida a algún nucleótido de guanina. Posteriormente el GTP se une a la proteína y ésta adquiere una conformación activa que, a su vez, estimula alostéricamente a las proteínas blanco. Las constantes de velocidad de disociación de GDP e hidrólisis de GTP intrínsecas de las proteínas G son pequeñas. Como ya se mencionó, existen dos clases de proteínas reguladoras que incrementan estas velocidades de reacción, las GNRPs (del inglés, Guanine Nucleotide Release Proteins; en español, Proteínas Liberadoras de Nucleótidos de Guanina) que catalizan la disociación de GDP y las GAPs (del inglés, GTPase Activating Proteins; en español, Proteínas Activadoras de GTPasa) que incrementan la velocidad de hidrólisis de GTP (McCormick, 1989; Boguski, 1993).

### 3. 7. 2. REGULACIÓN DE p21<sup>ras</sup> POR GAPs

La mayoría de las células expresan dos tipos de GAPs, la tipo I (p120<sup>GAP</sup>) y la NF1-GAP. Estas proteínas poseen actividades similares. Todas las GAPs de p21<sup>ras</sup> contienen el motivo *Phe-Leu-Arg* dentro de la región más conservada de su dominio catalítico.

La proteína p120<sup>GAP</sup> posee dominios SH2 y SH3, a través de los cuales se asocia con la proteínas fosforiladas en tirosinas. Los dominios SH2/SH3 de las GAP no activan a p21<sup>ras</sup>, aunque esta actividad es necesaria para la completa estimulación de la transcripción. NF1-GAP no contiene los dominios SH2/SH3 presentes en p120<sup>GAP</sup>, aunque comparte el dominio de activación de GTPasa. Esto indica que los diferentes complejos activos de p21<sup>ras</sup> pueden tener diversos blancos celulares (Pronk, 1994).

### 3. 8. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Las regiones promotoras de los genes *ras* no contienen cajas TATA ni cajas CAT, pero contienen múltiples motivos GC y utilizan más de un sitio de inicio de la transcripción. El promotor de N-*ras* humano contiene secuencias homólogas a los sitios de unión de CREB ATF (secuencia consenso: TGACGTA/CA/G), AP-1 (TGAG/CTCA), AP-2 (CCCCAGGC), MYB (CA/CGTTA/G), E4TF1 (GGAAGTG) y MLTF MYC (CCACGTGA) (Hesketh, 1995).

### 3. 9. MUTACIONES ONCOGÉNICAS

#### 3. 9. 1. MODELOS EXPERIMENTALES DE INCIDENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES *ras*

La familia de proto-oncogenes *ras* hasta ahora es de las mas estudiadas en cuanto a la adquisición de potencial transformante debido a la acción mutagénica directa de ciertos carcinógenos. Diversos modelos animales de carcinogénesis química se han estudiado para poder analizar el espectro, incidencia y reproducibilidad de las mutaciones del gen *ras* en tumores iniciados ya sea por una sola dosis o la exposición repetida a diferentes carcinógenos.

En modelos animales (en tumores inducidos física o químicamente en roedores) la frecuencia de mutaciones de *ras* es del 70%. El 86% de los tumores mamarios inducidos en ratas por una dosis única de nitrosometilurea (NMU), presentan mutaciones puntuales de una sola base en la segunda posición del codón 12 (Gly12) en donde existe una transición de la guanina por adenina en el gen H-*ras*. El DMBA (dimetilbenzantraceno) también activa al gen H-*ras* durante la inducción de tumores mamarios en ratas o ratones y en células transformadas *in vitro*, creando una transición de adenina a timina en la segunda base del codón 61. Esta mutación también ocurre en carcinomas de piel inducidos químicamente en murinos y las mutaciones en las primeras dos bases del codón 61 surgen tanto en hepatomas espontáneos como inducidos. N-*ras* y K-*ras* también pueden activarse por algún tratamiento químico o de rayos X y el carcinógeno alquilante N-metil-N'-nitrosoguanidina (MNNG) puede activar a K-*ras* y a H-*ras*. Esto indica que en estos tumores inducidos químicamente, la mutagénesis directa de algún gen *ras* puede jugar un papel crítico en las etapas tempranas del desarrollo tumoral (Hesketh,1995).

En la mayoría de los tumores animales inducidos por carcinógenos, las lesiones transformantes se localizan en los oncogenes K-, N- o H-*ras* en la

primera o segunda posición de los codones 12, 13 y 61 (Bos, 1987). Estos hallazgos colocan a los miembros de la familia de oncogenes *ras* entre los objetivos mayores de la acción mutagénica de carcinógenos ambientales. Entre los agentes carcinógenos que producen mutaciones puntuales de *K-ras* se encuentran los agentes alquilantes (transiciones de G a A) e hidrocarburos policíclicos aromáticos y aminas heterocíclicas (transversiones de G a T) (Urosevic, 1993).

La evidencia de estudios celulares sobre el gen *ras* ha corroborado los datos que proporciona la patología y epidemiología del cáncer espontáneo que surge en los diferentes tejidos humanos, sugiriendo que la transformación es un proceso que ocurre por lo menos en dos etapas. Por esta razón, el gen *ras* mutante de los tumores humanos sólo transforma fibroblastos primarios transfectados cuando se han suplementado con oncogenes que inmortalizan a las células, como por ejemplo *c-myc*, *v-myc*, *N-myc*, EA1 de adenovirus, *p53* mutante o el antígeno T mayor de poliovirus. Los fibroblastos normales no se transforman por *ras* viral ni celular. Sin embargo, los fibroblastos NHI 3T3 si se pueden transformar por sobreexpresión de las proteínas  $p21^{ras}$  normales. Esto indica que la función transformante de los proto-oncogenes *ras* depende de la sobreexpresión, debida a promotores heterólogos o a potenciadores, y que esta actividad puede verse incrementada cuando están presentes mutaciones puntuales en el gen (Hesketh, 1995).

En ciertos tipos celulares, como pueden ser células eritroides y mieloides humanas, la expresión de  $p21^{ras}$  aumenta la tasa de crecimiento sin alterar el fenotipo diferenciado de estas células.

Las mutaciones presentes en cualquiera de los residuos críticos para activar el potencial oncogénico de *ras* (Gly12, Gly13, Ala59 y Gln61), inhiben la hidrólisis del GTP, ya sea porque disminuyen la actividad de GTPasa o porque varían la velocidad de intercambio de nucleótidos (Ala59). La sustitución de cualquier aminoácido en Gly12 (con excepción de prolina) causa transformación; esta

transformación correlaciona con la tendencia a la formación de  $\alpha$  hélices (Gly y Pro rompen  $\alpha$  hélices). La Gly12 se localiza dentro del asa que une al fosfato  $\beta$ ; cualquier sustitución en esta posición, aumenta el tamaño de la proteína, lo que resulta en la disminución de la actividad de GTPasa (Fig. 2.3a). Las mutaciones oncogénicas permiten que el complejo GTP-p21<sup>ras</sup> permanezca en una forma activa (efecto similar a los análogos de GTP resistentes a hidrólisis o a la toxina del cólera en las proteínas G). Se cree que esta forma activa estimula que se promueva el crecimiento. La mutación Thr59 confiere actividad de autofosforilación en la proteína (Hesketh, 1995).

### 3. 10. MUTACIONES DE LOS GENES *ras* EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER

La incidencia de mutaciones de *ras* en cáncer humano varía de acuerdo a los diferentes tejidos. Se ha reportado desde un 6% de mutaciones en cáncer de vejiga, hasta 75%-90% en cáncer de páncreas, pasando por 30% en pulmón, 40% seminomas, 50% en tiroides y alrededor de un 10% en diversas leucemias (Weinberg 1989; Fearon,1993), además de otros carcinomas como colangiocarcinomas (Levi, 1991), estómago, endometrio (Duggan, 1994), ovario (Ichikawa, 1994) y sarcomas (Kahn, 1987).

En estudios realizados en cáncer de páncreas se ha encontrado que las mutaciones en el gen *K-ras* son más frecuentes que las mutaciones en otros genes, por ejemplo p53 (Berrozpe, 1994).

Las diferencias en la activación de los oncogenes *ras* en los diferentes tipos de cáncer son muy claras. Sin embargo, las razones de las diferencias en la activación de *K-ras* aún no se conocen. Probablemente están involucradas características intrínsecas en los patrones de expresión de *K-ras* en los diferentes tejidos, así como la probable exposición a ciertos carcinógenos o mutágenos específicos (Kahn, 1987).



### 3. 10. 1. MUTACIONES DE K-*ras* EN CÁNCER COLORRECTAL

Se ha reportado que alrededor del 50% de los pacientes que padecen cáncer colorrectal, contienen en sus células mutaciones en el gen K-*ras* (Forrester, 1987; Shaw, 1991; Pretlow, 1993). Estos estudios se han realizado en diversas poblaciones del mundo, encontrándose datos interesantes en cuanto a la frecuencia y al tipo de mutaciones presentes en los codones 12, 13 y 61 de K-*ras*. Se ha observado que la frecuencia de mutaciones en las diferentes poblaciones, determinadas por diferentes métodos experimentales, se encuentra en un rango que va aproximadamente del 32 al 73% (Tabla 9.1). Las diferencias principales son en cuanto al tipo de mutaciones. En general, se ha reportado que el tipo de mutaciones mas frecuentes en los codones 12 y 13, incluyen transiciones de G a A en la primera (Gly-Ser) y en la segunda (Gly-Asp) posición, además de transversiones G-T en la primera (Gly-Cys) y en la segunda base (Gly-Val) (Moerkerk et al, 1994). Con relación al codón 61, se ha reportado que las mutaciones ocurren con mucho menor frecuencia (Finkelstein, 1993; Hayashi, 1996; Morris, 1996). Sin embargo, existen diferencias en cuanto al tipo de mutaciones presentes en los codones 12 y 13 de K-*ras* que se han asociado a la etnia y el ambiente, factores que varían de población a población (Oudejans, 1991; Capella, 1991; Urosevic, 1993; Hayashi, 1996)

### 3. 11. CORRELACIÓN DE LAS MUTACIONES DE K-*ras* CON LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES.

En los diferentes estudios que se han realizado en cáncer colorrectal, uno de los objetivos principales ha sido la asociación de los datos moleculares de las mutaciones de diversos genes, con los datos clínicos de los pacientes, para lograr encontrar marcadores tumorales de pronóstico y diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, a la fecha poco ha sido el avance en esta área de la investigación. Con respecto al oncogén K-*ras*, los diversos grupos han

publicado resultados contrastantes. Mientras que en algunos trabajos no encuentran correlación entre los datos clínicos de los pacientes y las mutaciones de K-ras (Vogelstein, 1988), algunos encuentran correlación de las mutaciones con estadio de Dukes (clasificación patológica que describe el grado de invasión tumoral) (Moerkerk, 1994), localización, sexo y edad de los pacientes (Breivick, 1994) o con la agresividad del tumor (Finkelstein, 1993). También se ha asociado el tipo y la frecuencia de las mutaciones con la sobrevivencia de los pacientes (Span, 1996). Estos estudios han aportado datos valiosos en cuanto a la asociación de las mutaciones con el curso clínico del paciente; sin embargo, no se ha logrado establecer una relación clara entre las mutaciones y los datos clínicos. Por otra parte, se han sugerido diversos factores, por ejemplo el tipo de población, la exposición a diferentes carcinógenos, factores dietéticos, etc., que participan de manera importante en el curso de la tumorigénesis colorrectal.

En este trabajo se planteó el estudio de las mutaciones presentes en los codones 12, 13 y 61 del gen K-ras en un grupo de tumores colorrectales de *pacientes mexicanos para conocer la frecuencia y el tipo de mutaciones que presenta esta población y correlacionar el tipo de mutaciones con los datos clínicos de los pacientes.*

## 4. HIPOTESIS

Como se mencionó anteriormente, en diversos trabajos publicados en la literatura científica, se ha reportado un alto índice de mutaciones en los codones 12 y 13, de *K-ras* en cáncer colorrectal de pacientes de diferentes poblaciones (Urosevic, 1993; Capella, 1991; Delattre, 1989; Oudejans, 1991; Faille, 1994). Con base en estos antecedentes se espera que en el grupo de tumores colorrectales de pacientes mexicanos se observen mutaciones en tales codones del gen *K-ras*.

La obtención de resultados similares a los reportados en otras poblaciones, podrían confirmar y ampliar los resultados previamente publicados para el gen *K-ras*.

Resultados cualitativa y cuantitativamente diferentes en relación a otras poblaciones, podrían implicar que las diferencias geográficas, factores ambientales, genéticos y culturales particulares de nuestra población, como la variedad de dietas, pudieran ser factores que contribuyen de manera importante en el desarrollo de la tumorigénesis colorrectal.

## 5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el análisis de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen *K-ras* en cáncer colorrectal se ha realizado en diversas poblaciones del mundo, a la fecha no se cuenta con datos que indiquen cuál es el tipo y la frecuencia de mutaciones este gen presentes en cáncer colorrectal de pacientes de la población mexicana. Es importante identificar estos datos desde el punto de vista epidemiológico, para conocer si la frecuencia y tipo de mutaciones en esta población son similares o diferentes a las publicadas para otras poblaciones (Urosevic, 1994; Delattre, 1989; Oudejans, 1991; Capella, 1991; Van den Broek, 1993), ya que dentro de las poblaciones descritas, se han observado variaciones en el análisis de las mutaciones del gen *K-ras*.

## 6. OBJETIVOS

## 6. 1. OBJETIVOS GENERALES

6. 1. 1. Detectar las mutaciones presentes en los codones 12, 13 y 61 del gen *K-ras* en tumores colorrectales provenientes de pacientes mexicanos.

6. 1. 2. Establecer el tipo y la frecuencia de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen *K-ras* en la población de tumores colorrectales de pacientes mexicanos.

6. 1.3. Correlacionar la presencia de mutaciones con los datos clínicos de los pacientes.

6. 1. 4. Comparar los resultados obtenidos de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de *K-ras*, con los datos publicados en la literatura para otras poblaciones del mundo.

## 6. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

6. 2. 1. Detectar por PCR-RFLP mutaciones en los codones 12 y 13 del gen *K-ras*.

6. 2. 2. Detectar por PCR-SSCP mutaciones en el codón 61 del gen *K-ras*.

6. 2. 3. Identificar por secuenciación, el tipo de mutaciones presentes en los codones 12, 13 y 61 de *K-ras*.



7. MATERIALES  
Y MÉTODOS

## *7. 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES Y ESPECÍMENES TUMORALES*

Entre 1992 y 1996, se colectaron en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional S. XXI (I.M.S.S.), 40 muestras de tejido tumoral de cáncer de colon y recto y su respectivo tejido normal. Era requisito indispensable que estas muestras fueran tomadas de piezas recién salidas de cirugías de colon y recto, sin importar la clasificación de Dukes que presentaran. Se enjuagaron con una solución de PBS pH 7.0, estéril y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido ( -195 °C). Tanto los tumores como los tejidos normales permanecieron almacenados en nitrógeno líquido hasta la extracción del DNA. Los datos clínicos de los pacientes se recopilaron de los expedientes que se encuentran en el Archivo del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S. Se incluyeron los siguientes datos: edad, sexo, localización del tumor, clasificación de Dukes, tratamiento radio y quimioterapéutico, recurrencia, metástasis y sobrevida.

## *7. 2. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO*

La extracción de DNA genómico del tejido congelado se realizó por métodos ya estandarizados (Sambrook, et al., 1989), utilizando la técnica de la digestión con proteinasa K (50 µg/ ml) y extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Posteriormente, se determinó la concentración y la pureza del DNA extraído por espectrofotometría y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, respectivamente. Una vez que se verificó que la integridad y la pureza del DNA fueran adecuadas, se prepararon alícuotas de cada muestra a una concentración de 100 ng/µL para la amplificación por PCR.

### 7. 3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *ras* POR PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) A PARTIR DE DNA GENÓMICO

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica simple para la amplificación de secuencias de DNA *in vitro*, que ha facilitado la detección de mutaciones de una gran cantidad de oncogenes y supresores tumorales, entre ellos *ras* y *p53*, además de otras alteraciones genéticas y el análisis del papel que desempeñan en la tumorigénesis.

La alta sensibilidad del PCR, permite amplificar secuencias de DNA a partir de cantidades muy pequeñas de tejido, como por ejemplo biopsias. Además, esta técnica puede amplificar DNA de tejido embebido en bloques de parafina (Capella et al., 1991).

Se amplificaron por separado, las regiones del DNA correspondientes al gen *K-ras*, que contenían los codones 12, 13 y 61. Se utilizaron los diferentes oligonucleótidos que se presentan en la tabla 7.2, con las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción de amplificación (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Condiciones para la amplificación por PCR.

Mezcla de reacción	Concentración final
Amortiguador PCR 10X (100mM Tris pH 8.3, 25mM MgCl <sub>2</sub> , 500mM KCl, 0.1% gelatina)	1X
dNTPs (10mM)	0.2mM de cada uno
Oligonucleótido I (sentido)	20 pmol
Oligonucleótido II (antisentido)	20 pmol
Taq-DNA Polimerasa (5U/μl)	1 U
DNA templado	100 ng
H <sub>2</sub> O destilada estéril	cbp 10μl

Para los codones 12 y 13, la mezcla de reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer-Cetus 2400, con un ciclo de desnaturalización de 5 min a 95 °C; 35 ciclos de: 1 min a 95 °C, 30 seg de hibridación de los iniciadores a 59 °C, 1 min de extensión a 72°C y un ciclo final de extensión de 5 min a 72 °C.

**Tabla 7.2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los codones 12 ,13 y 61 de K-ras.**

Oligonucleótido	Secuencia
<b>Sentido 12</b>	5'-TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3'
<b>Antisentido 12</b>	5'- GTC CTG CAC CAG TAA TAT GC-3'
<b>Sentido 13</b>	5'-GCC TGC TGA AAA TGA CTG AA-3'
<b>Antisentido 13</b>	5'-CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAG G-3'
<b>Sentido 61</b>	5'-TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG-3'
<b>Antisentido 61</b>	5'-CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA-3'

**Tabla 7.3. Enzimas utilizadas para la detección de las mutaciones de los codones 12 y 13 de K-ras.**

Gen	Mutación	Oligos PCR	Enzima	Longitud	Comentarios
K-ras	12 todas	S 12, AS 12	Mva I*	141	WT dig; mut no dig
K-ras	13 todas	S 13, AS 13	Hae III	71	WT dig; mut no dig

Oligos: oligonucleótidos; WT: tipo silvestre; mut: mutantes; dig: digerido;  
\*: isoesquisómero de Bst NI.

#### 7.4. PATRONES EN FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE RESTRICCIÓN (P C R-R F L P)

El análisis por fragmentos de restricción permite detectar mutaciones por la presencia de fragmentos de DNA que no son digeridos por la enzima. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo bajo las condiciones que a continuación se mencionan (Tabla 7.4) con las enzimas de digestión utilizadas para los respectivos codones (Tabla 7.3).

**Tabla 7.4. Condiciones utilizadas para la digestión enzimática**

Mezcla de digestión	Concentración final
Enzima (8-10 U/ $\mu$ l)	1-2 unidades
Amortiguador 10X	1X
H <sub>2</sub> O destilada estéril	cbp 5 $\mu$ l

Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó con el producto de amplificación por aproximadamente 3-4h a 37°C. Se realizó una segunda digestión para asegurar que no hubieran productos amplificados, parcialmente digeridos. Se utilizaron las mismas concentraciones de los reactivos de la digestión anterior, sólo que esta mezcla de reacción se dejó incubando a 37°C por toda la noche.

Después de la segunda digestión, los productos de amplificación digeridos se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%. Se migraron a 200V por espacio de 2-2.5h y finalmente se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml) para poder observarlos en un transiluminador de luz U. V. a 300 nm de longitud de onda. Como control negativo se utilizó DNA de leucocitos de un sujeto sin cáncer y como control positivo para el codón 12, se utilizó un plásmido con una mutación en este codón del gen K-ras (pEJ ras<sup>val12</sup>) (Miranda, 1996).

## 7. 5. POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENAS SENCILLAS (P C R-S S C P)

Se utilizó un par de oligonucleótidos adecuados para amplificar un fragmento del exón 2, de 129 pares de bases, que contiene la región que incluye el codón 61 del gen K-ras. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestra en la Tabla 7.2 (Nikiforov, 1996).

La amplificación de esta región se realizó utilizando un desoxinucleótido marcado radiactivamente con  $P^{32}$  ( $\alpha P^{32}$ -dCTP). Brevemente, las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes:

**Tabla 7.5. Condiciones de amplificación para SSCP**

Mezcla de reacción	Concentración final
Amortiguador PCR 10X	1X
Oligonucleótido I (sentido)	20 pmol
Oligonucleótido II (antisentido)	20 pmol
dNTPs (10 mM)	0.2 mM de cada uno
{ $\alpha$ - $^{32}P$ }dCTP	1 $\mu$ Ci
Taq DNA-polimerasa (5U/ $\mu$ l)	1 U
DNA templado	100 ng
H <sub>2</sub> O destilada estéril	cbp 10 $\mu$ L

La mezcla de reacción se incubó durante 35 ciclos a las temperaturas de desnaturalización (95°C), hibridación de los oligonucleótidos (60°C) y de extensión de la polimerasa (72°C). Terminada la reacción de amplificación, se agregó a cada una de las muestras, 9  $\mu$ L de una solución amortiguadora para detener la reacción ("stop buffer", apéndice A), además de 2  $\mu$ L de una solución de NaOH 0.1M ; esto con el fin de lograr la completa

desnaturalización del DNA. Estas mezclas se incubaron a 95°C por 15 min y en seguida en hielo, para posteriormente realizar la electroforesis.

Previamente en el laboratorio, se realizaron experimentos de estandarización de la técnica, para encontrar las condiciones óptimas de resolución para el fragmento que se estaba analizando. Con base en estos resultados, la electroforesis de las muestras se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturalizantes, con 5% de glicerol, a 3 W por 15 h a temperatura ambiente. En seguida, el gel se secó al vacío en un secador de geles, y posteriormente, se expuso en placas de rayos X sensibles (Kodak, X-O-MAT). A los 3-4 días, la placa se reveló y se realizó un análisis del desplazamiento de las muestras. Debido a que cuando existen mutaciones hay cambios en la secuencia nucleotídica del DNA, las hebras sencillas de esta molécula en las muestras mutadas adquieren una conformación diferente a la de las muestras normales, por lo que migran en una posición diferente en el gel. De esta manera es fácil identificar aquellas muestras que presentan mutaciones.

#### *7. 6. ANÁLISIS DE MUTACIONES POR SECUENCIACIÓN*

Del análisis por RFLP y SSCP, se eligieron las muestras que presentaban una migración diferente, para confirmar e identificar por secuenciación la presencia de alguna mutación. El DNA de los productos no digeridos (codones 12 y 13, PCR-RFLP) y de los que mostraron un desplazamiento electroforético diferente (codon 61, PCR-SSCP), se purificó utilizando técnicas de purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa o de poliacrilamida (Sambrook, 1989). Utilizando la técnica de la Thermo Sequenase DNA polymerase (Amersham), que es una modificación de la técnica de Sanger, las muestras se secuenciaron y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes (con 7M de urea). Esta

técnica combina innovaciones en cuanto a la secuenciación del DNA utilizando radiactividad. La marca se incorpora al DNA utilizando cuatro didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados radiactivamente con  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$  Estos son más eficientes ya que marcan específicamente las cadenas de DNA terminadas, es decir, se evita la presencia de "artefactos" y bandas de fondo. Además de estas innovaciones, la Thermo Sequenasa es una enzima que se diseñó para incorporar eficientemente los didesoxinucleótidos, lo que permite que se utilicen pequeñísimas cantidades de isótopo para las reacciones de terminación.

Las condiciones de reacción para la secuenciación fueron las que se presentan en la tabla 7.6.

**Tabla 7.6. Condiciones de reacción para la secuenciación.**

Reactivos	Volumen final
Amortiguador de reacción concentrado 10X (260 mM Tris-HCl, pH 9.5, 65mM MgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ L
Thermo Sequenase (Amersham) 4 U/ $\mu$ L (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween-20, 0.5% Nonidet P-40, 50% glicerol)	2 $\mu$ L (8 U)
dGTP <i>Termination master mix</i> (7.5 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP; dTTP)	2 $\mu$ L
ddNTPs, 0.3 $\mu$ M $\{\alpha\text{-}^{33}\text{P}\}$ -ddNTP (450 $\mu$ Ci/mL)	0.5 $\mu$ L de cada uno
Oligonucleótido cebador	0.5-2.5 pmol
DNA molde purificado	50-500 ng o 25-250 fmol
H <sub>2</sub> O destilada estéril	cbp 20 $\mu$ L



En cuatro tubos marcados (G, A, T, C), se colocaron 2  $\mu\text{L}$  del dGTP-*Termination master mix*, y se añadió a cada tubo 0.5  $\mu\text{L}$  de su respectivo didesoxinucleótido marcado (mezcla 1). Posteriormente, en otro tubo se colocaron 2  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción 10X, 50-500 ng de DNA molde, 0.5-2.5 pmol de cebador, 2  $\mu\text{L}$  de la enzima Thermo Sequenase polymerase (4 U/ $\mu\text{L}$ ) y el volumen se ajustó a 20  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril (mezcla 2). De la mezcla 2, se colocaron 4.5  $\mu\text{L}$  a cada tubo con la mezcla de terminación (mezcla 1). Esta última mezcla de reacción se colocó en el termociclador y se inició el siguiente programa de secuenciación cíclica:

Nº de ciclos	Temperatura	Duración
1	95 °C	1min
35	95 °C	30 seg
	48 °C	30 seg
	72 °C	1 min

Una vez terminado el programa de PCR, se realizó el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturizantes (con 7M de urea). El gel se pre-migró a 35 W constantes por aproximadamente 30 min. Antes de cargar las muestras al gel, se desnaturizaron añadiéndoles 4  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora "stop" e incubándolas a 70-72°C durante 2-10 min y posteriormente hielo. Sin dejar que el gel se enfriara demasiado, las muestras se cargaron en el orden G, A, T, C. Se migraron a 35 W constantes por aproximadamente 2.5 h, con una solución de TBE 0.5X como amortiguador de electroforesis. Una vez terminada la migración, el gel se secó y se expuso a una película sensible a rayos X. Después de exponerla durante 4-5 días se reveló y se analizaron los resultados por medio de la lectura de las secuencias.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS CODONES 12, 13 Y 61 DEL GEN K-ras

De acuerdo a las condiciones mencionadas en el capítulo 7 (Materiales y Métodos), se realizó la amplificación por PCR de tres regiones del gen K-ras, las cuales contenían cada una los codones 12, 13 y 61. Se observaron los productos de amplificación de estas regiones, cada uno con el par de oligonucleótidos correspondientes. Se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado, 141, 71 y 129 pb respectivamente, tanto de las muestras del tejido tumoral como del normal (Fig. 8.1).

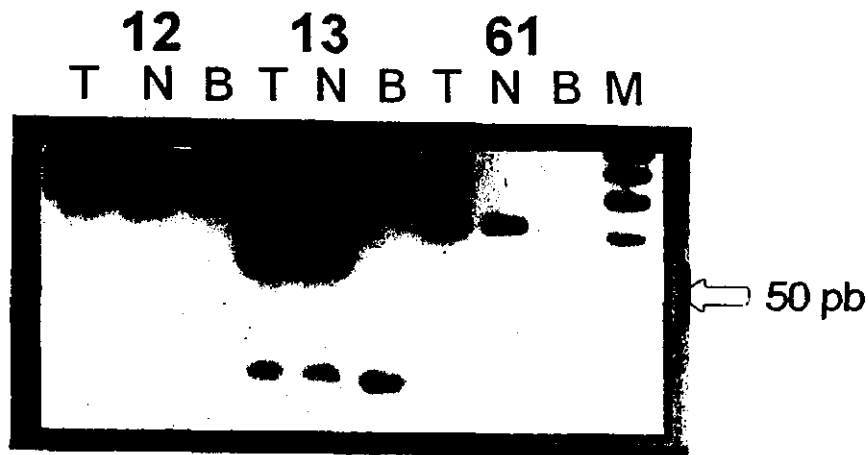


Fig. 8.1. Amplificación por PCR de las regiones que contienen los codones 12, 13 y 61 del gen K-ras. Carril M: Marcador de peso molecular; N: DNA normal obtenido de sangre periférica; T: DNA tumoral. Las flechas indican los tamaños de los fragmentos.

## 8.2 ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES POR RFLPs

Las mutaciones puntuales generan o destruyen sitios de restricción en las secuencias genómicas de algún gen de interés, lo que permite su rápida detección cuando estas secuencias se han amplificado previamente por PCR. Cuando la mutación genera que un sitio de restricción previamente presente se destruya, ésta se hace evidente por la presencia de fragmentos de DNA sin digerir. Desafortunadamente, no todas las mutaciones puntuales crean o destruyen sitios de restricción y, por lo tanto, no son detectables por medio de este procedimiento. Sin embargo, con el uso de oligonucleótidos para PCR que contienen desapareos relativos a la secuencia blanco, es decir, cambios deliberados en la secuencia del oligonucleótido, se supera esta limitación. Después de los primeros ciclos de amplificación *in vitro*, los fragmentos de DNA han incorporado las secuencias de los oligonucleótidos que generan nuevos sitios de restricción. La mayor ventaja de esta técnica es que no requiere el uso de isótopos radiactivos (Shibata, 1990). La sensibilidad de este método es bastante alta, ya que las mutaciones se detectan por fragmentos de DNA no digeridos, lo que incluye no sólo las secuencias mutantes, sino también moléculas híbridas entre las hebras silvestre y mutante de DNA (Fig. 8.2).

Actualmente se ha utilizado esta metodología del RFLP para detectar mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 del gen K-ras (Capella, 1991; Gallinger, 1995).

A manera de ejemplificar la técnica, se describe brevemente el procedimiento para detectar cualquier mutación en el codón 12 (GGT) (Fig. 8.2). Se reemplaza la segunda G del codón 13 (GGC) por una A (GAC), utilizando un oligonucleótido o cebador que genere un sitio de desapareo con una sola base; este desapareo produce un sitio de corte (GGTGA) para la enzima seleccionada. Este sitio de restricción se altera si existe una mutación de cualquiera de las dos Gs del codón 12. Las mutaciones de las siguientes

bases, T y G, no se consideran ya que no aparecerán dentro de la secuencia que se amplificará por PCR.

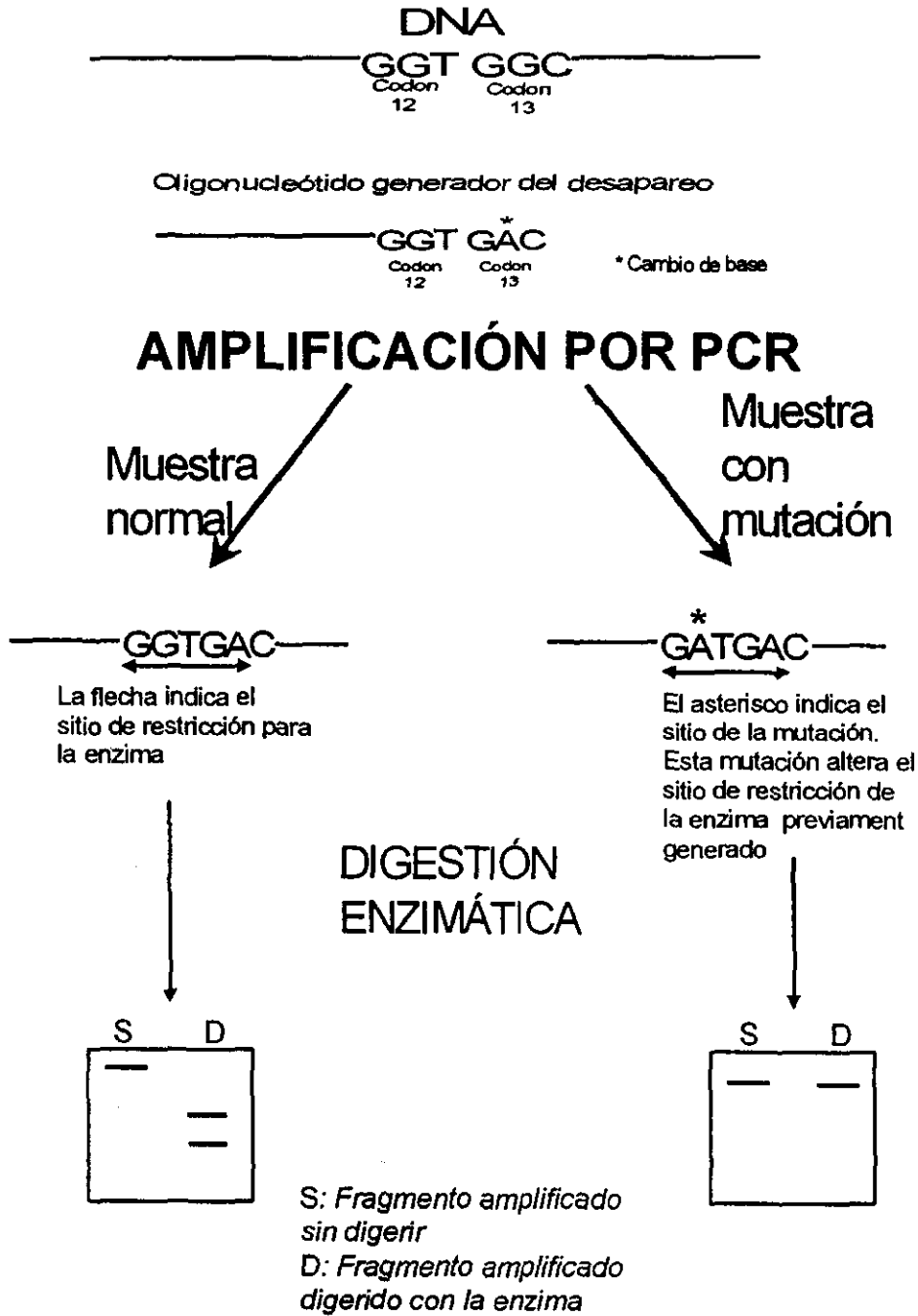


Fig. 8.2. Descripción de la técnica de análisis de mutaciones por PCR-RFLP.

### **8.2.1. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES POR PCR-RFLP EN EL CODÓN 12 DE K-ras**

Para la detección de las mutaciones en el codón 12 del gen K-ras, se realizó por PCR-RFLP el análisis de los 40 tumores colorrectales de pacientes mexicanos. La enzima utilizada (Mva I) digirió las muestras que no presentaron mutaciones, dando origen a dos fragmentos de 23 y 118 pb; por otro lado, los fragmentos de PCR no digeridos mostraban muestras que presentaban mutaciones en el codón 12 de K-ras. En la Fig. 8.3 se muestra un ejemplo de estos resultados. Se encontró que el 25% de las muestras (10/40) presentaron mutaciones en este codón del gen K-ras.

### **8.2 ANÁLISIS POR PCR-RFLP DE LAS MUTACIONES EN EL CODÓN 13 DE K-ras.**

Para verificar la presencia de mutaciones en el codón 13, también se analizaron por PCR-RFLP las 40 muestras de tumores colorrectales. De manera similar que la enzima Mva I (codón 12), la enzima Hae III no digirió las muestras que presentaban mutaciones; las muestras normales si se digirieron, dando origen a dos fragmentos, uno de 49 y otro de 22 pb. Posterior a la amplificación de las muestras y a la digestión de las mismas con la enzima Hae III, se encontró que el 5% (2/40) de los tumores presentaron mutaciones en este codón (Fig. 8.4).

### **8.3 ANÁLISIS POR PCR-SSCP DE LAS MUTACIONES EN EL CODÓN 61 DE K-ras.**

Por el método de PCR-SSCP, se determinó la frecuencia de mutaciones en el codón 61 del gen K-ras en los 40 tumores colorrectales. Se encontró que sólo una muestra (2.5%) presentó una mutación en este codón (Fig. 8.5), por lo que se procedió con el análisis de la secuencia de este fragmento, así como de las muestras de los codones 12 y 13 que también presentaron mutaciones.

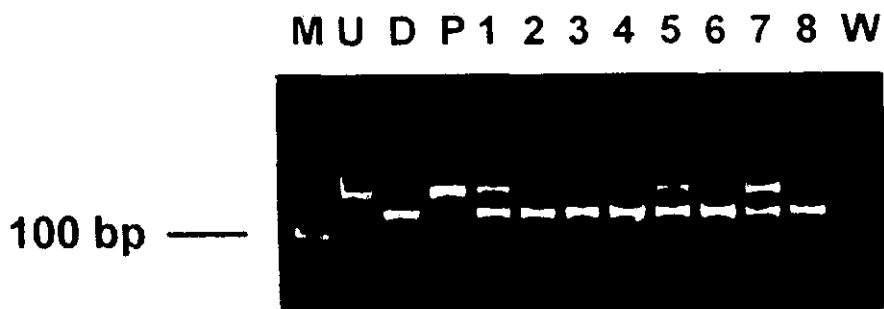


Fig. 8.3. Análisis de las mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras* por PCR-RFLP. Carril M: Marcador de peso molecular (escalera de 10pb); carril U: Mucosa normal no digerida; carril D: Mucosa normal digerida; carril P: Plásmido control con una mutación conocida en el codón 12 (*pEJ ras<sup>val12</sup>*) (Miranda, 1996). Carriles 1-8: Muestras tumorales digeridas con *Bst*NI; carril W: control de agua.



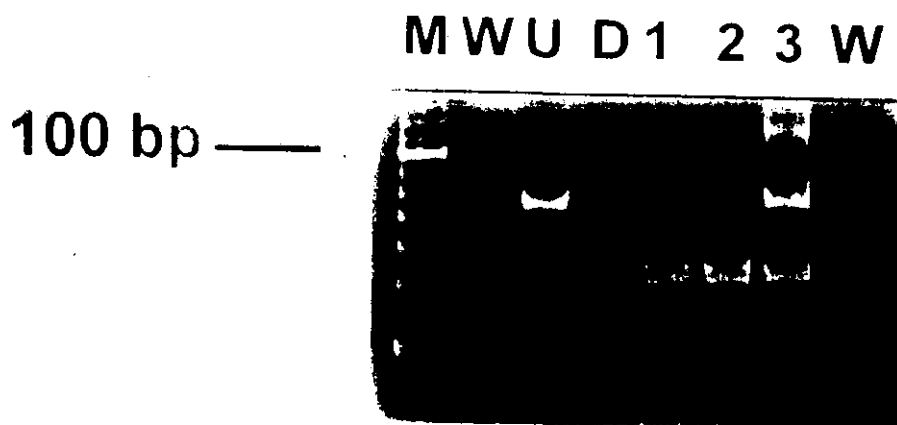


Fig. 8.4. Análisis de las mutaciones del codón 13 del gen *K-ras* por RFLP. Carril M: Marcador de peso molecular (escalera de 10pb); carril U: Mucosa normal no digerida; carril D: Mucosa normal digerida. Carriles 1-3: Muestras tumorales digeridas con *HaeIII*; carril W: control de agua.

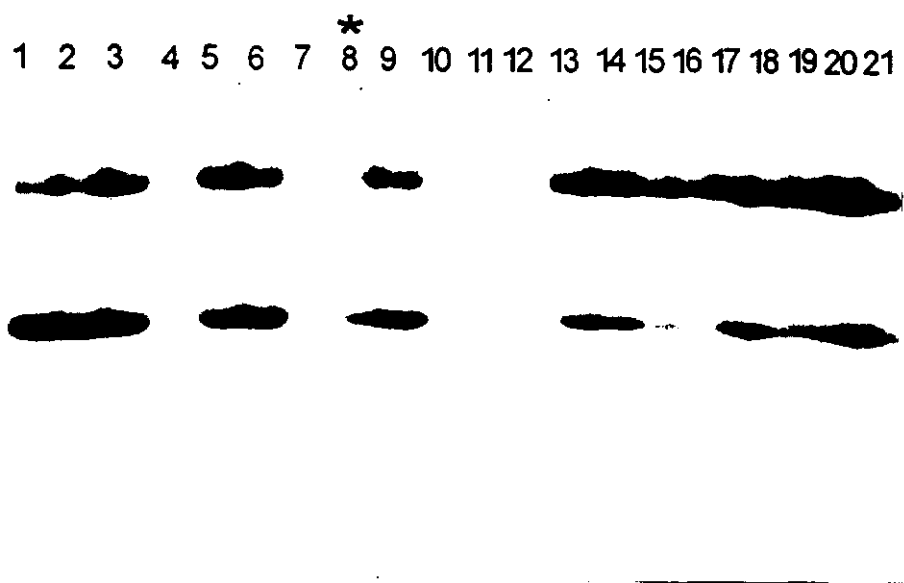


Fig. 8.5. Análisis de las mutaciones en el codón 61 del gen *K-ras* por PCR-SSCP. Carriles 1-21: Muestras tumorales desnaturalizadas. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y con 5% de glicerol. Se migró a 3 W por 14-16 h a temperatura ambiente. En el carril 8 se observa un corrimiento electroforético diferente, por lo que esta muestra se seleccionó para el análisis de la secuencia.

## 8.5 ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES POR SECUENCIACIÓN

Posteriormente se confirmó la presencia de las mutaciones por medio del análisis por secuenciación y se identificó el tipo de mutación presente en cada una de estas muestras. Cabe mencionar que, debido a la presencia de células normales en el homogenado tumoral, en algunas muestras se observa una mezcla de DNA normal y tumoral. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que existan células heterocigotas para la mutación. En los resultados analizados para el codón 12 (Tabla 8.1), se observa que 3/10 (30%) muestras presentan un cambio de glicina por serina, 5/10 (50%) presentan un cambio de glicina por aspártico, 1/10 (10%) cambia a cisteína y 1/10 (10%) cambia a alanina. Un ejemplo del análisis por secuenciación se muestra en la Fig. 8.6 en donde se observan los cambios de las bases que codifican para el codón 12. La presencia de mutaciones puntuales en el DNA, implica cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína, que finalmente producen una proteína alterada en su función normal (Hesketh, 1995).

El análisis de estos resultados muestra que en el 80% (8/10) de las muestras se presentan transiciones de G a A. De estas transiciones, tres ocurren en la primera base y cinco en la segunda. Este tipo de transiciones se han asociado a agentes alquilantes como posibles carcinógenos (Moerkerk, 1994). Por otro lado, sólo el 20% (2/10) de las muestras presentó transversiones de G a C en la segunda base (T136) y de G a T en la primera base (T192). Estos cambios, por su parte, se han relacionado con la presencia de carcinógenos del tipo de hidrocarburos policíclicos aromáticos y aminas aromáticas como probables agentes mutágenicos (Urosevic, 1993).

**Tabla 8.1. Análisis por secuenciación de las muestras con mutaciones en el codón 12 del gen K-ras.**

MUESTRA	SECUENCIA	AMINOÁCIDO	TRANSICIONES (Ts) O TRANSVERSIONES (Tv)
Normal	GGT	Glicina	Ninguna
T 70	GAT	Ac. aspártico	Ts. G a A, 2ª base
T 124	GAT	Ac. aspártico	Ts. G a A, 2ª base
T 136	GCT	Alanina	Tv. G a C, 2ª base
T 140	GAT	Ac. aspártico	Ts. G a A, 2ª base
T 142	AGT	Serina	Ts. G a A, 1ª base
T 144	AGT	Serina	Ts. G a A, 1ª base
T 154	AGT	Serina	Ts. G a A, 1ª base
T 176	GAT	Ac. aspártico	Ts. G a A, 2ª base
T 184	GAT	Ac. aspártico	Ts. G a A, 2ª base
T 192	TGT	Cisteína	Tv. G a T, 1ª base

Del análisis de mutaciones específicas para el codón 13, se encontró que las mutaciones presentes eran cambios de GGC (codón normal) a GAG, cambiando el aminoácido normal glicina a glutámico (Tabla 8.2), siendo transiciones de G a A en la segunda base del codón.

**Tabla 8.2. Análisis por secuenciación de las muestras con mutaciones en el codón 13 del gen K-ras.**

MUESTRA	SECUENCIA	AMINOÁCIDO	TRANSICIONES (Ts) O TRANSVERSIONES (Tv)
Normal	GGC	Glicina	Ninguna
T 108	GAG	Ac. glutámico	Ts. G a A, 2ª base
T 146	GAG	Ac. glutámico	Ts. G a A, 2ª base

En cuanto a los resultados obtenidos para el codón 61, se observó que la mutación presente daba un cambio del aminoácido normal glutamina a histidina (Tabla 8.3).

**Tabla 8.3. Análisis por secuenciación de las muestras con mutaciones en el codón 61 del gen K-ras.**

MUESTRA	SECUENCIA	AMINOÁCIDO	TRANSICIONES (Ts) O TRANSVERSIONES (Tv)
Normal	CAA	Glutamina	Ninguna
T 118	CAT	Histidina	Tv. A a T, 3ª base

T144 T176 T184 T192  
 GATC GATC GATC GATC

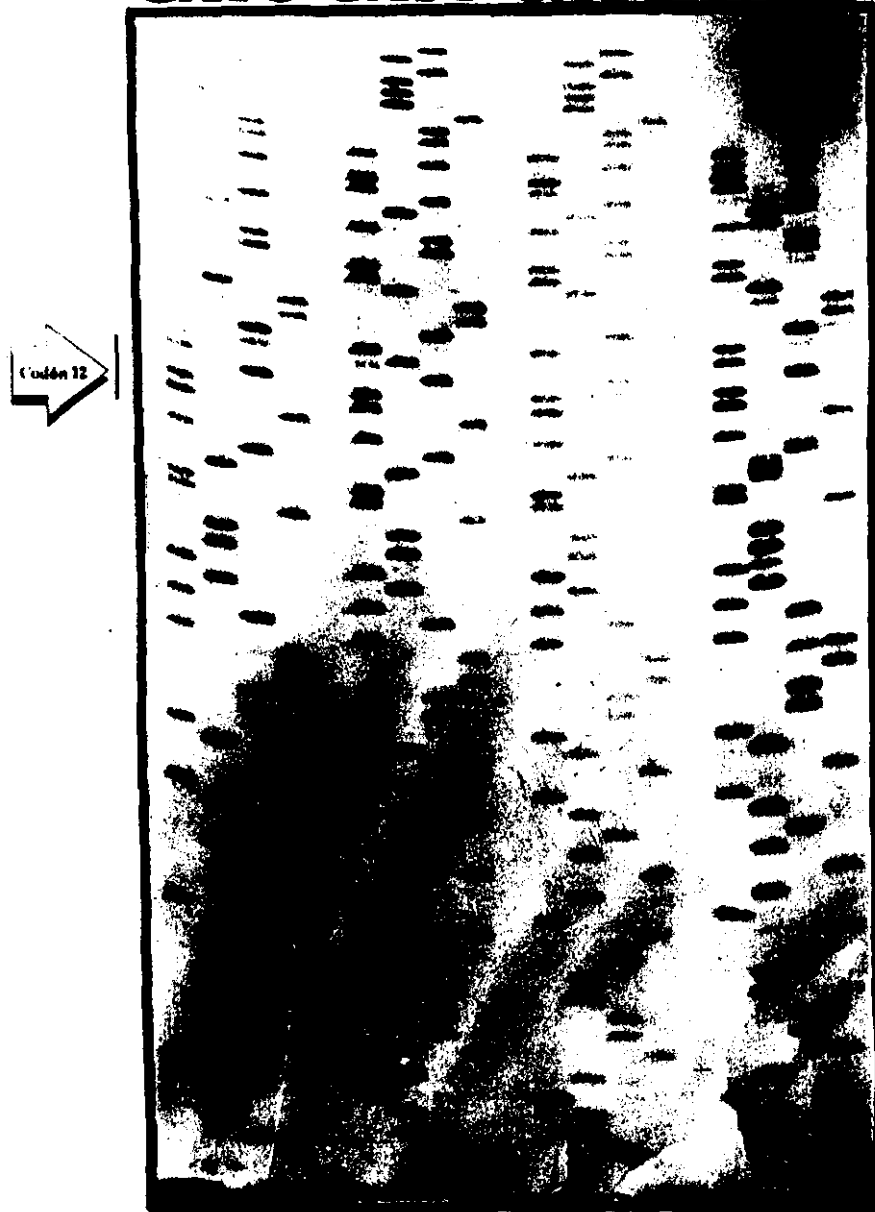


Fig. 8.6. Ejemplo del análisis por secuenciación de las muestras con mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras*. Se purificó el DNA de las muestras que presentaron mutaciones en el codón 12, previamente analizadas por la técnica de PCR-RFLP. Posteriormente se realizó la secuencia del fragmento de aproximadamente 120 pb, que contenía la región del codón 12. La flecha indica el sitio en donde se encuentra este codón. Los carriles representan la lectura de cada una de las cuatro bases (G, A, T, C) para cada muestra. T: tumor; T144: AGT (lectura en el codón 12); T176: GAT (lectura en el codón 12); T184: GAT(lectura en el codón 12); T192: TGT (lectura en el codón 12). La secuencia normal del codón es GGT.

## 8.6 ANÁLISIS DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES

De los expedientes que se encuentran en el Archivo del Hospital de Oncología (C. M. N. S. XXI. I.M.S.S.), se recopilaron los datos clínicos de los pacientes.

Dentro de estos datos se incluyeron:

- Edad del paciente
- Sexo
- Localización del tumor dentro del colon, es decir, si el tumor se encontraba de lado derecho o de lado izquierdo del colon.
- Estadio de Dukes. Esta clasificación utilizada por patólogos, da indicaciones acerca del grado de invasión del tumor con respecto a las diferentes capas celulares del colon. El estadio Dukes A se refiere a la invasión de la mucosa y submucosa del colon (epitelio colónico). El estadio B es la invasión del tumor hacia el interior de la pared intestinal, llegando al músculo liso; el estadio C es la diseminación de células tumorales a ganglios linfáticos y por último el estadio D se refiere a la invasión a ganglios linfáticos y metástasis a distancia del tumor primario (Solano, 1997).
- Tratamiento previo, es decir, si los pacientes recibieron radio y quimioterapia antes de la intervención quirúrgica.
- Metástasis, para referir los sitios a donde se presentó este fenómeno.
- Recurrencia, es decir, si el paciente ya había presentado algún tipo de padecimiento oncológico previo a la cirugía de colon.
- Sobrevida, para incluir, en su caso, las causas de muerte o para conocer si los pacientes operados ya no presentaron recurrencia.

Se incluyó la información que se consideró importante para la posible correlación entre estos datos y los resultados del análisis molecular. En la tabla 8.4 se presenta el resumen de estos datos. La edad de los pacientes va de 16 a 89 años, siendo el promedio 58.45 años. De estos pacientes el 50% (20/40) fueron del sexo femenino y el otro 50% del sexo masculino. El 5%

(2/40) presentaron un estadio de Dukes A, el 52.5% (21/40) Dukes B, el 30% (12/40) Dukes C y el 2.5% (1/40) Dukes D. El 10% restante (4/40) no fue clasificado en relación al estadio de Dukes.

Se encontró que el 25% (10/40) de los pacientes presentó mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras*. De estos pacientes, el 60% (6/10) fueron del sexo femenino y el 40% (4/10) del sexo masculino. Con respecto a la clasificación del tumor, se encontró que el 10% (1/10) presentó estadio Dukes A, el 60% (6/10) Dukes B, ningún tumor presentó Dukes C o D y el 30% (3/10) de las muestras con mutación pertenecía al grupo de tumores sin clasificación de Dukes determinada. De estas 10 muestras el 80% de los tumores estaba localizado de lado izquierdo del colon, es decir, en el área sigmoide-rectal, mientras que el 10% se encontró del lado derecho del colon. El 10% restante pertenecía a un paciente con PAF (Poliposis Adenomatosa Familiar), que es un síndrome hereditario en el que se presentan cientos de miles de pólipos a lo largo de todo el colon. Eventualmente uno de estos pólipos benignos, se transformará en adenoma o adenocarcinoma (malignos).

Por otra parte, cabe resaltar la importancia de la sobrevida de los pacientes, ya que el 90% de los pacientes con cáncer de recto que presentaron mutaciones en el codón 12 de *K-ras* mostraron una sobrevida sin actividad tumoral, es decir, estaban vivos y sin recurrencia ni metástasis.

En relación a las mutaciones del codón 13 del gen *K-ras*, se encontró el 5% (2/40) de los pacientes con este tipo de mutación. De estos pacientes el 50% (1/2) fue del sexo femenino y el otro 50% de sexo masculino. Los dos pacientes presentaron un tumor clasificado como Dukes C. Sin embargo, uno de los tumores estaba localizado del lado izquierdo del colon, mientras que el otro se encontró de lado derecho. Estos pacientes ya habían fallecido, uno sin actividad tumoral y otro con metástasis a ganglios linfáticos.

En relación con las mutaciones presentes en el codón 61, solo se encontró un paciente (2.5%) con este tipo de mutación. Este paciente era del sexo



femenino, con una clasificación tumoral Dukes C y con metástasis a ganglios linfáticos.

Finalmente, no se encontró una correlación significativa (prueba de Spearman) entre los datos clínicos y las mutaciones de *K-ras*; sin embargo, se pudo establecer un tipo de asociación entre las mutaciones en el codón 12 de *K-ras* de los pacientes con cáncer de recto que presentaron un estadio Dukes B y la supervivencia de estos pacientes. El 90% de este grupo de pacientes con mutaciones en el codón 12 de *K-ras*, se encontraban vivos sin actividad tumoral.

Por otra parte, también se pudo establecer una asociación entre los tumores con mutaciones en los codones 13 o 61 del gen *K-ras* y el estadio Dukes, ya que los tumores presentaron una clasificación Dukes C.

Tabla 8.4. RECOPIACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Dukes	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Sobrevida	Codon mutado	Cambio de aa
T 70	62	F	Ciego	B	-	NO	NO	VSAT	12	Asp
T 72	75	F	Ciego	C	+	ganglios	NO	NR		
T 76	81	F	Recto	C	+	NR	SI	NO		
T 80	43	M	Recto	B	+	NO	NO	VSAT		
T 88	72	F	Recto	C	+	ganglios	NO	MSAT		
T 90	58	M	Recto	B	+	NO	NO	VSAT		
T 96	27	M	PAF	B	NR	NO	NO	NO		
T 100	62	M	Sigmoides	B	+	NO	NO	VSAT		
T 104	45	M	Recto	B	+	NO	NO	VSAT		
T 106	70	M	Recto	B	+	NO	NO	VSAT		
T 108	64	M	Sigmoides	C	+	ganglios	SI	NR	13	Glu
T 110	65	M	Sigmoides	D	+	hígado	SI	MCAT		
T 116	86	F	Recto	B	+	NO	NO	NO		
T 118	62	F	Recto	C	+	ganglios	NO	VSAT	61	His
T 120	52	M	Recto	B	+	pulmón y cerebro	SI	MCAT		
T 122	59	F	Sigmoides	B	+	NO	NO	VSAT		
T 124	63	M	Recto	ND	+	NO	NO	MSAT	12	Asp
T 128	88	M	Recto	B	-	NO	SI	NR		
T 132	61	F	Ciego	C	+	óseas	SI	MCAT		
T 134	60	M	Recto	C	+	ganglios	NO	VSAT		

F/M:masc/fem; PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar; RT/QT: radio/quimio terapia; +/- : recibió/no recibió; VSAT: vivo sin actividad tumoral; VCAT:vivo c/actividad tumoral; MSAT:muerto sin actividad tumoral; MCAT:muerto c/ actividad tumoral; NR: no reportado; ND: no determinado.

Tabla 8.4. RECOPIACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES (CONTINUACIÓN)

Nº de tumor	Edad	Sexo	Localización	Dukes	RT/QT	Metástasis	Recurrencia	Sobrevida	Codon mutado	Cambio de aa
T 136	59	F	Recto	B	+	NO	NO	VSAT	12	Ala
T 138	74	M	Recto	A	NR	NO	NO	VSAT		
T 140	25	M	PAF	ND	NR	NO	NO	VSAT	12	Asp
T 142	66	M	Recto	B	+	NO	NO	VSAT	12	Ser
T 144	56	F	Sigmoides	A	NR	NO	NO	VSAT	12	Ser
T 146	53	F	Ciego	C	NR	NO	NO	MSAT	13	Glu
T 148	67	M	Recto	C	+	hígado	NO	MCAT		
T 150	67	F	Sigmoides	B	NR	NO	NO	VSAT		
T 152	75	F	Canal anal	B	+	NO	SI	VSAT		
T 154	50	F	Canal anal	B	NR	NO	SI	VSAT	12	Ser
T 172	57	F	Sigmoides	C	+	NO	NO	VSAT		
T 174	89	M	Izquierdo	B	NR	NO	SI	VSAT		
T 176	52	M	Sigmoides	B	NR	NO	NO	VSAT	12	Asp
T 180	16	F	Peutz-Jegher	ND	NR	NO	NO	NR		
T 184	53	F	Recto	B	+	NO	NO	VSAT	12	Asp
T 186	57	F	Sigmoides	B	NR	NO	NO	VSAT		
T 188	57	M	Ciego	B	NR	NO	NO	VSAT		
T 190	32	M	Izquierdo	C	NR	NO	NO	VSAT		
T 192	56	F	Recto	ND	+	NO	NO	VSAT	12	Cys
T 194	22	F	Sigmoides	C	NR	NO	NO	VSAT		

F/M:masc/fem; PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar; RT/QT: radio/quimio terapia;+/- : recibió/no recibió; VSAT: vivo sin actividad tumoral; VCAT:vivo c/actividad tumoral; MSAT:muerto sin actividad tumoral; MCAT:muerto c/ actividad tumoral; NR: no reportado; ND: no determinado.

## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo, se realizó el análisis de la frecuencia y el tipo de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen *K-ras* en un grupo de tumores colorrectales de pacientes mexicanos. Se encontró que esta población presentó un patrón de frecuencia de mutaciones del gen *K-ras* (32.5%) dentro del rango de los previamente reportados en la literatura para otras poblaciones del mundo (32-73%, Tabla 9.1). Dentro de las mutaciones presentes, se encontró que el 76.9% (10/13) se encontraron en el codón 12 y el 15.38% (2/13) en el codón 13. Este patrón de frecuencias concuerda con los datos reportados, los cuales muestran que el codón 12 es el que presenta un mayor porcentaje de mutaciones en comparación con otros codones (DeBenedetti, 1993; Pretlow, 1993; Gallinger, 1995). Por otra parte, el 7.69% (1/13) de las mutaciones se encontró en el codón 61 del gen *K-ras*. Este codón es, de los que se han analizado, el que presenta una menor frecuencia de mutaciones. De hecho existen trabajos en donde no encuentran mutaciones en este codón en otras poblaciones estudiadas, como la estadounidense (Finkelstein, 1993); la yugoslava (Urosevic, 1993); o la japonesa (Hayashi, 1996). Estos datos apoyan y amplían el hecho de que las mutaciones en *K-ras* en cáncer colorrectal son un evento frecuente en el desarrollo de la tumorigénesis colorrectal.

Por otro lado, se encontró que el tipo de mutaciones presentes varía en la población mexicana, en comparación con algunas otras poblaciones. Se ha reportado que las poblaciones europeas, como la yugoslava y la francesa, presentan con mayor frecuencia transversiones G a T de las bases en los codones 12 y 13 de *K-ras* (Urosevic, 1993; Delattre, 1989) mientras que las poblaciones de Estados Unidos y de Japón presentan más frecuentemente transiciones de G a A en el codón 12 de *K-ras* (Capella, 1991; Hayashi, 1996). Es importante conocer el tipo de mutaciones que se encuentran presentes en las diferentes poblaciones, ya que éstas se han asociado a diferentes tipos de

carcinógenos. La presencia de transversiones G a T se ha asociado a agentes carcinogénicos del tipo de hidrocarburos policíclicos aromáticos y aminas heterocíclicas, mientras que las transiciones G-C a A-T se asocian a la presencia de agentes alquilantes (Richardson, 1987; Urosevic, 1994). Este trabajo mostró que la población mexicana presenta un mayor porcentaje de transiciones de G a A (76.9%), similar a los resultados reportados para las poblaciones estadounidense y japonesa. Esto apoya la idea de que los factores externos, como la exposición a los diferentes tipos de carcinógenos ambientales (agentes alquilantes), influyen en la presencia de mutaciones específicas para cada población estudiada (Hayashi, 1996; Urosevic, 1994).

Se han realizado estudios donde se ha reportado que no existe una correlación aparente entre la presencia de alguna mutación en *K-ras* en carcinomas de colon, y la localización anatómica del tumor, la invasividad, el nivel de diferenciación, la edad o el sexo del paciente (Bos, 1989). Sin embargo, existen algunos otros reportes en donde se logra establecer una correlación entre las mutaciones de *K-ras* y el estadio de Dukes (Moerkerk, 1994), la edad, sexo y localización del tumor (Breivick, 1994), la agresividad del tumor (Finkelstein, 1993) o la sobrevivencia de los pacientes asociada al tipo de mutaciones presentes en *K-ras* (Senagore, 1997).

En este trabajo se observó una correlación entre las mutaciones y el estadio de Dukes de los tumores. Los tumores con mutaciones en el codón 12 de *K-ras*, presentaron un estadio Dukes B (60%),.

Los tumores con mutaciones en los codones 13 o 61 presentaron un estadio Dukes C (100%). La mayoría de mutaciones presentes en los tumores Dukes B fueron transiciones mientras que las mutaciones de los tumores Dukes C fueron transversiones. Estos datos amplían la información publicada, en donde se encuentra una correlación entre el tipo de mutaciones de los

tumores con el estadio de Dukes (Moerkerk, 1994). Los tumores que presentaron transiciones G a A estaban clasificados como Dukes B, mientras que los que presentaron transversiones G a T estaban clasificados como Dukes C. En base a estos resultados, se sugiere que las transversiones G-T y/o G-C confieren a las células tumorales la capacidad de producir metástasis, mientras que las transiciones G-A no confieren esta capacidad, por lo que se considera que las mutantes G-T pueden ser más agresivas que las mutantes G-A. Estos resultados son importantes ya que implican que los tumores pueden seguir diferentes vías de tumorigénesis y que eventualmente, algunas de estas vías serán más agresivas que otras.

Existen trabajos en los que se ha resaltado que las mutaciones en *K-ras*, y aún algunas mutaciones en particular confieren cierta agresividad del tumor, lo que influye en el curso de la enfermedad del paciente.

Finkelstein (1993) realizó un análisis del grado de agresividad del tumor relacionado con el tipo de mutaciones de *K-ras*. En este trabajo encuentran que las mutaciones menos agresivas son los cambios a valina en el codón 12, mientras que las demás sustituciones las considera agresivas, particularmente el cambio a aspártico en el codón 12 (Tabla 9.2). También considera que las mutaciones de aspártico en el codón 13 son favorables. Se sugiere que la mayoría de estos cambios confiere un potencial metastásico, incluyendo algunos tumores que no presentan mutaciones en *K-ras*.

Recientemente, se realizó un estudio donde no se encontró una correlación entre las mutaciones de *K-ras* con la clasificación de Dukes (Senagore, 1997); sin embargo, sí se logró establecer una correlación entre el tipo de mutación (cambio de aminoácido) y la sobrevivencia de los pacientes con cáncer colorrectal. En este trabajo se sugiere que cuando aparecen mutaciones en

los codones 12 y 13 y el cambio de aminoácido es de Gly a Asp, los pacientes cursan con un buen pronóstico de sobrevida.

**Tabla 9.2. Clasificación tumoral en base a las características de K-ras**

Tipo de mutación	Características del tumor
Asp-13 (GGC-GAC)	Muy indolente; no se observan depósitos metastásicos
Val-12 (GGT-GTT)	Indolente; capacidad de metástasis a nodos pericolónicos; no se observa metástasis a vísceras
Normal (GGT)	Crecimiento principalmente local, con tendencia a esparcimiento transcolémico
Todas las mutaciones en 12	Agresivos; capacidad de metástasis a nodos linfáticos pericolónicos y a hígado; algunos con esparcimientos distantes
Asp-12 (GGT-GAT)	Muy agresivo; se disemina rápidamente del sitio primario; se presenta en la mayoría de las metástasis hematogénicas

Indolente se refiere a un genotipo en el que no se han identificado metástasis a vísceras (Tomado de Finkelstein, 1993)

Nuestros resultados apoyan los previamente publicados (Finkelstein, 1993; Senagore, 1997), en relación al tipo de mutaciones presentes en el codón 12. Estos autores reportan que la mayoría de mutaciones en el codón 12 de K-ras, son cambios de glicina a aspártico. Como se mencionó anteriormente, se encontró que el 50% de las mutaciones en el codón 12, para la población estudiada, fueron cambios de glicina a aspártico.

Por otra parte, se encontró que la mayoría de los pacientes que presentaron cambios por aspártico en el codón 12, mostraron una sobrevida sin actividad tumoral. Estos resultados contrastan con algunos autores (Finkelstein, 1993), quienes proponen que las mutaciones por aspártico son muy agresivas.



Sin embargo, otros autores (Senagore, 1997) han encontrado que los pacientes con este cambio (Gly a Asp) presentan una buena sobrevida. Nuestros resultados coinciden con éstos últimos.

Los resultados de este trabajo también pueden apoyarse en el modelo de tumorigénesis colorrectal (Fearon, 1990), en el que se propone que las mutaciones de K-ras ocurren generalmente en las etapas tempranas del desarrollo tumoral. En base a este modelo, se puede pensar que los tumores que presentan mutaciones en K-ras, que se han desarrollado de acuerdo a este modelo, se encuentran en etapas relativamente tempranas del desarrollo tumoral (Dukes B), razón por la cual se puede suponer que no son tan agresivos y que, además, son susceptibles a los tratamientos terapéuticos, que impedirán que continúe el desarrollo tumoral. Por otro lado, se puede pensar que los tumores que presentaron mutaciones en los codones 13 y 61 y que presentaron un estadio Dukes C, son más agresivos, ya sea porque son tumores en etapas intermedias, en donde ya han participado otros mecanismos de tumorigénesis (alteraciones en p53, apc, etc) o se han desarrollado por alguna otra vía de carcinogénesis colorrectal, diferente al modelo propuesto.

Por estas razones, los resultados de este trabajo permiten apoyar la propuesta de otros grupos, de utilizar al gen K-ras como un posible indicador de buen pronóstico de sobrevida para pacientes con cáncer colorrectal.

**Tabla 9.1. Comparación de frecuencias de las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen K-ras en diferentes poblaciones del mundo.**

País	Autor, año	Codon(es) analizados	Porcentaje de mutaciones	Métodos utilizados
Holanda	Oudejans, 1991	12, 13, 61	32% (16/50)	PCR/Dot blot
Francia	Laurent-Puig, 1991	12, 13	39% (39/99)	PCR/Dot blot
España	Shaw, 1991	12, 13	48% (11/23)	PCR/Secuenciación
U S A	Capella, 1991	12, 13	39% (126/316)	PCR/RFLP
Italia	DeBenedetti, 1993	12	62.5% (15/24)	PCR/SSCP
Yugoslavia	Urosevic, 1993	12, 13	33%A;46%B;58%C	PCR/Dot blot
U S A	Pretlow, 1993	12	73% (11/15)	PCR/Dot blot
Holanda	Moerkerk, 1994	12, 13	50%B (17/31); 50%C (22/42)	PCR/SSCP/ Secuenciación
Canadá	Gallinger, 1995	12	36% (7/19)	PCR/RFLP
Japón	Hayashi, 1996	12, 13, 61	33.9% (108/319)	PCR/MASA
México	Segura J., Quintero A., 1997	12, 13, 61	32.5% (13/40)	PCR/RFLP/SSCP/ Secuenciación

A: Duker A; B: Duker B; C: Duker C; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: Fragmentos polimórficos de restricción; SSCP: Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla; MASA: Amplificación específica de alelos mutantes.

## 10. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo es una forma de acercarse al conocimiento de las características que se presentan en la tumorigénesis colorrectal de pacientes mexicanos, que tienen orígenes étnicos y culturales distintos a los de otras poblaciones del mundo. Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

- El 32.5% (13/40) de las muestras estudiadas de pacientes con cáncer colorrectal, presentó mutaciones en los codones estudiados del gen K-ras. El 25% (10/40) de estos pacientes presentó mutaciones en el codón 12; el 8% (2/40) en el codón 13 y el 4% (1/40) en el codón 61 del gen K-ras. Esto indica que la población mexicana presenta un patrón de mutaciones que se encuentra dentro del rango reportado para otras poblaciones del mundo.
- El 76.9% (10/13) y el 15.38% (2/13) de las mutaciones presentes se encontraron en los codones 12 y 13, respectivamente, mientras que tan solo el 7.69% (1/13) de las muestras presentó mutaciones en el codon 61 del gen K-ras.
- Con respecto al tipo de mutaciones presentes, se encontró un mayor porcentaje de transiciones (cambios de purina a purina o pirimidina a pirimidina) (77%) que de transversiones (purina a pirimidina o viceversa) (23%); estos datos son similares a los reportados para las poblaciones americana y japonesa.
- Con relación a los datos clínicos se encontraron las siguientes frecuencias: de los tumores que presentaron mutaciones en K-ras el 61.5% de los pacientes fueron de sexo femenino; el 70% presentó una invasividad moderada (estadio de Dukes A+B); el 90.9% de los tumores con mutación se localizaron del lado izquierdo del colon; el 80% de los pacientes no

presentó recurrencia de la enfermedad y por último el 84% se encuentra vivo sin actividad tumoral.

- Se observó una asociación entre las mutaciones y la clasificación de los tumores; es decir, el 60% (6/10) de los tumores con mutaciones en el codón 12 presentaron un estadio Dukes B, mientras que el 100% (3/3) de los tumores con mutaciones en los codones 13 y 61 presentaron un estadio Dukes C.
- De los tumores con mutaciones presentes en el codon 12, el 50% presentó una transición G a A en la segunda base del codon, cambiando el aminoácido Gly por Asp. Se encontró una asociación entre este tipo de mutación y la sobrevida de los pacientes. Aquellos pacientes con esta mutación en el codón 12, presentaron una mejor sobrevida que los que no tenían mutaciones en K-*ras*.
- Los datos obtenidos de la frecuencia y tipo de mutaciones en el gen K-*ras* en tumores colorrectales provenientes de pacientes mexicanos, apoyan y amplían la información obtenida para otras poblaciones del mundo.
- El gen K-*ras* podría utilizarse como un marcador molecular de buen pronóstico y sobrevida para los pacientes con cáncer colorrectal en la población mexicana.

## II. REFERENCIAS

Avruch J., Zhang X. and Kyriakis J. M. Raf meets Ras: completing the framework of signal transduction pathway. *TIBS* **19**, 279-283 (1994).

Bernards André. Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signaling: filling in the GAPs. *Biochim. et Biophys. Acta* **1242**, 43-59 (1995).

Berrozpe G., Schaeffer J., Peinado M. A., Real F. X. and Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **58**, 185-191 (1994).

Bishop J.M., and Weinberg R. A. *Molecular Oncology*. Scientific American Inc. New York, (1996).

Boguski M. S. and McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-653 (1993).

Bos J. L., Fearon E. R., Hamilton S. R., Verlaan-de Vries M., van Boom J. H., van der Eb A. J., and Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**, 293-297 (1987).

Bos Johannes L. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* **49**, 4682-4689 (1989).

Breivik J., Meling G. I., Spurkland A., Rognum T. O. and Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patients age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer* **69**, 367-371 (1994).

Burgering B. M. T. and Bos J. L. Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *TIBS* **20**, 18-22 (1995).

Cano E. and Mahadevan L. C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* **20**, 117-122 (1995).

Capella G., Cronauer-Mitra S., Peinado M.A. and Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-Ki-ras gene in human tumors. *Environmental Health Perspectives* **93**, 125-131 (1991).

Chang, H. C., Karim F. D., O'Neill E. M., Rebay I., Solomon N. M., Therrien M., Wassarman D. A., Wolff T. and Rubin G.M. Ras signal transduction pathway in *Drosophila* eye development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. LIX. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994).

Chuang Chiou-Fen and Ng Sun-Yu. Functional divergence of the MAP kinase pathway ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Letters* **346**, 229-234 (1994).

Coopersmith C., Chandrasekaran C., McNevin M. and Gordon J. Bi-transgenic mice reveal that K-ras Val12 augments a p53-independent apoptosis when small intestinal villus enterocytes reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.* **138**, 167-179 (1997).

DeBenedetti L., Varesco I., Pellegata N. S., Losi L., Gismondi V., Casarino L., Sciallero S., Bonelli L., Biticci R., Bafico A., Masetti E., James R., Heouaine A., Ranzani G. R., Aste H., and Ferrara G. Genetic events in sporadic colorectal adenomas : K-ras and p53 mutations are not sufficient for malignant progression. *Anticancer Res.* **13**, 667-670 (1993).



Delattre O., Law D.J., Remvikos Y., Sastre X., Feinberg A., Olschwang S., Melot T., Salmon R.J., Validiere P. and Thomas G. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* II, 353-356 (1989).

Duggan B. D., Felix J. C., Muderspach L. Y., Tsao J. L. and Shibata D. K. Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Research* 54, 1604-1607 (1994).

Dukes C. E. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.* 35, 323-332 (1932).

Faille A., De Cremoux P., Extra J. M., Linares G., Espie M., Boursstyn E., De Rocquancourt A., Giacchetti S., Marty M., and Calvo F. p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *British J. Cancer*, 69, 114-118 (1994).

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

Fearon Eric. K-ras gene mutation as a pathogenic and diagnostic marker in human cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, N° 24, 1978-1980 (1993).

Finkelstein S. D., Sayegh R., Bakker A. and Swalsky P. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. *Arch. Surg.* 128, 526-532 (1993).

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

Forrester K., Almoguera C., Lama C., Dunitz J., Kawanishi H., Grizzle W., and Perucho M. Expression and Mutational Activation of the c-Ki-ras Oncogene in Human Colorectal Adenomas and Carcinomas. Familial Adenomatous Polyposis, Alan R. Liss, Inc. pages 337-346 (1990).

Gallick G., García Roy., Staley C., Moskal T., Hang S., and Chakrabarty S. Molecular alterations during colon tumorigenesis: an overview of growth regulatory pathways and potential therapeutic implications. The Cancer Bulletin 46, N° 4, 296-302 (1994).

Gallinger S., Vivona A. A., Odze R. D., Mitri A., O'Bierne C. P., Berk T. C. and Bapat B. V. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in periampullary adenomas and carcinomas from familial adenomatous polyposis patients. Oncogene 10, 1875-1878 (1995).

Georgiannos S. N., Weston P. and Goode A. (1993). Micronutrients in gastrointestinal cancer. Br. J. Cancer 68, 1195-1198.

Hackford Alan W. (1993). Biochemical markers for colorectal cancer. Surgical Clinics of North America 73, N° 1, 85-102.

Hancock John F. Anti-ras drugs come of age. Current Biology 3, N° 11, 770-772 (1993)

Hanski C., Bornhoeft G., Shimoda T., Hanski M., Lane D., Stein H. and Riecken E. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. Cancer 70, 2772-2777 (1992).

Hayashi N., Suagi S., Ito I., Nakamori S., Ogawa M. and Nakamura Y. Ethnic difference in the pattern of *K-ras* oncogene mutations in human colorectal cancers. *Human Mutation* **8**, 258-261 (1996).

Henson D., Block G. and Levine M. Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *J. National Cancer Institute* **83**, 547-550 (1991).

Hesketh Robin. *The Oncogene Handbook*. Academic Press. pp 378-413 (1995).

Ichikawa Y., Nishida M., Suzuki H., Yoshida S., Tsunoda H., Kubo T., Uchida K., and Miwa M. Mutation of *K-ras* protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors. *Cancer Research* **54**, 33-35 (1994).

Jordano J. and Perucho M. Initial characterization of a potential transcriptional enhancer for the human *c-K-ras* gene. *Oncogene* **2**, 359-366 (1988).

Kahn S., Yamamoto F., Almoguera C., Winter E., Forrester K., Jordano J., and Perucho M. The *c-Ki-ras* gene and human cancer (Review). *Anticancer Research* **7**, 639-652 (1987).

Kampman E., Goldbohm R. A., van den Brandt P. A. and van't Veer P. Fermented dairy products, calcium and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Research* **54**, 3186-3190 (1994).

Khine K., Smith D. and Goh H. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* **73**, 28-35 (1994).

Kodaki T., Woscholski R., Hallberg B., Rodriguez-Viciano P., Downward J., and Parker P. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Current Biology* **4**, 798-806 (1994).

Lanfrancone L., Pelicci G., and Pelicci P. G. Cancer Genetics. *Curr. Op. in Genetics and Development* **4**, 109-119 (1994).

Laurent-Puig P., Olschwang S., Delattre O., Validire P., Melot T., Mosseri V., Salmon R. J., and Thomas G. Association of Ki-ras Mutations with Differentiation and Tumor-Formation Pathways in Colorectal Carcinoma. *Int. J. Cancer* **49**, 220-223 (1991).

Leevers S. J., Paterson H. F. and Marshall C. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414 (1994).

Levi S., Urbano-Ispizua A., Gill R., Thomas D. M., Gilbertson J., Foster C. and Marshall C. J. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Research* **51**, 3497-3502 (1991).

Lu X., Park S. H., Thompson T. C. and Lane D. *ras*- induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated *ras* and *myc* together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* **70**, 153-161 (1992).

Marais R., Light Y., Peterson H.F. and Marshall C.J. Ras recruits Raf to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal* **14**, N° 13, 3136-3145 (1995).

Maruta H. and Burgess A. W. Regulation of the Ras signalling network. *BioEssays* **16**, N° 7, 489-496 (1994).

Mastromarino A. J. and Curley S. A. Colorectal cancer. *The Cancer Bulletin* **46**, N° 4, 291 (1994).

McCormick Frank. *ras* GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* **56**, 5-8 (1989).

McCormick Frank. Raf: the holy grail of Ras biology? *TICB* **4**, 347-349 (1994a).

McCormick Frank. Activators and effectors of *ras* p21 proteins. *Curr. Opin. in Genetics and Development* **4**, 71-76 (1994b).

Mendoza-Rodríguez A., Morillón I., Cerbón M. A., Luna P., Santiago-Payán H., and Quintero A. Differential expression of *c-fos*, *c-myc* and *c-Ki-ras* oncogenes in colorectal cancer from mexican patients. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* **44**: 77-79 (1996).

Minamoto T., Sawaguchi K., Mai M., Yamashita N., Sugimura T. and Esumi H. Infrequent *K-ras* activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Research* **54**, 2841-2844 (1994).

Minamoto T., Yamashita N., Ochiai A., Mai M., Sugimura T., Ronai Z., and Esumi H. Mutant *K-ras* in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. *Cancer* **75**, 1520-1526 (1995).

Miranda E., Santana C., Rojas E., Hernández S., Ostrosky-Wegman P., and García-Carrancá A. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutation Research* **349**, 173-182 (1996).

Moerkerk P., Arends W., van Driel M., de Bruijne A., de Goeij and Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Research* **54**, 3376-3378 (1994).

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).

Morris R., Curtis L., Romanowski P., Hardcastle J., Jenkins D., Robinson M., Wyllie A., and Bird C. Ki-ras mutations in adenomas: a characteristic of cancer-bearing colorectal mucosa. *Journal of Pathology* **180**, 357-363 (1996).

Newmark H., and Lipkin M. Calcium, vitamin D and colon cancer. *Cancer research Suppl.* **52**, 2067s-2070s (1992).

Nikiforov Y. E., Nikiforova M. N., Gnepp D. R. and Fagin J. A. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene* **13**, 687-693 (1996).

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879 (1989).

Oudejans J., Slebos R., Zoetmulder F., Mooi W. and Rodenhuis S. Differential activation of *ras* genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int. J. Cancer* **49**, 875-879 (1991).

Prendergast G. and Gibbs J. B. Ras regulatory interactions: novel targets for anti-cancer intervention? *BioEssays* **16**, No. 3, 187-191 (1994).

Pretlow T., Brasitus T., Fulton N., Cheyer C. and Kaplan E. K-*ras* mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, N° 24, 2004-2007 (1993).

Pronk G. J. and Bos J. The role of p21<sup>ras</sup> in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1198**, 131-147 (1994).

Ramael M., Deblier Y., Eerdeken C., Lemmens G., Jacobs W. and Van Marck E. Immunohistochemical staining of Ras oncogene product in neoplastic and non-neoplastic mesothelial tissues: immunoreactivity for N-Ras and lack of immunohistochemical staining for Ha-Ras and K-Ras. *J. of Pathol.* **169**, 421-424 (1993).

Richardson K. K., Richardson F. C., Crosby R. M., Swenberg J. A., and Skopek T. R. DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 344-348 (1987).

Salcedo M., Arana R., Segura J., Martínez I., Hidalgo A. y Franco C. Realidades en el diagnóstico molecular del cáncer. *Ciencia y Desarrollo* **141**, 21-27 (1998).

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 9.14-9. 23 . (1989).

Schlessinger Joseph. How receptor tyrosine kinases activate Ras. TIBS 18, 273-275 (1993).

Segura Uribe Julia. Establecimiento de un banco de DNA de tumores provenientes de pacientes con cáncer colorrectal. Tesis Profesional. Facultad de Química, U. N. A . M. (1995).

Senagore A. J., and Biener J. T. A newly identified pattern of K-ras mutations at codons 12 and 13 is associated with long-term survival in colorectal cancer. Surgery 122, N° 4, 765-770 (1997).

Shaw P., Tardy S., Benito E., Obrador A. and Costa J. Occurrence of Ki-ras and p53 mutations in primary colorectal tumors. Oncogene 6, 2121-2128 (1991).

Shibata D., Capella G. and Perucho M. Mutational activation of the c-Ki-ras gene in human pancreatic carcinoma. Bailliere's Clinical Gastroenterology 4, N° 1, 151-169 (1990).

Shibata D., Schaeffer J., Li Z. H., Capella G. and Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. J. Natl. Cancer Inst. 85, N° 13, 1058-1062 (1993).

Sikora K., Chan S., Evan G., Gabra H., Markham N., Stewart J. and Watson J. Gene therapy for cancer. Cancer 59, 1289-1295 (1987)



Skibber J. M., Curley S. A., and Lotan R. Colon tumor markers for prognosis and therapy. *The Cancer Bulletin* **46**, Nº 4, 331-335 (1994).

Solano P. A. Detección de mutaciones del gen p53 en tumores de pacientes mexicanos con cáncer de recto. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, U. N. A. M. México D.F. (1997).

Span M., Moerkerk P., De Goeij A. and Arends J. W. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **69**, 241-245 (1996).

Urosevic N., Krtolica K., Skaro-Milic A., Dujic A. and Knezevic-Usaj S. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int. J. Cancer* **54**, 249-254 (1993).

Van den Broek M., Renault B., Fodde R., Verspaget H., Griffioen G. and Khan P. Sites and types of p53 mutations in an unselected series of colorectal cancers in The Netherlands. *Anticancer Res.* **13**, 587-592 (1993).

Vogelstein B., Fearon E., Hamilton S., Kern S., Preisinger A., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smiths A., and Bos J. Genetic alterations during colorectal tumor development. *New Engl. J. Med.* **319**, 525-532 (1988).

Wargovich M. J., and Mastromarino A. J. Dietary factors in the etiology and prevention of colon cancer. *The Cancer Bulletin* **46**, Nº 4, 303-308 (1994).

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

White M. A., Nicolette C., Minden A., Polverino A., Van Aelst L., Karin M. and Wingler M. H. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* **80**, 533-541 (1995).

Yamauchi N., Kiessling A. A. and Cooper G.M. The Ras/Raf signaling pathway is required for progression of mouse embryos through the two-cell stage. *Mol. and Cell Biol.* **14**, N° 10, 6655-6662 (1994).

Yokota J., Tsunetsugu-Yokota Y., Battifora H., Le Fevre C. and Cline M. Alterations of *myc*, *myb*, and *ras*<sup>Ha</sup> proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* **231**, 261-265 (1986).

Zhu D., Keohavong P., Finkelstein S., Swalsky P., Bakker A., Weissfeld J., Srivastava S., and Whiteside T. K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Research* **57**, 2485-2492 (1997).

Zhuang S. M., Cochran C., Goodrow T., Wiseman R. W. and Söderkvist P. Genetic alterations of p53 and ras genes in 1,3-butadiene- and 2',3'-dideoxycytidine-induced lymphomas. *Cancer Research* **57**: 2710-2714 (1997).

SIGLAS

DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FTPasa	Proteína farnesiltransferasa
GAP	Proteína activadora de la GTPasa
GDP	Guanosina difosfato
GNEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
Grb-2	Proteína-2 unida al receptor del factor de crecimiento
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H- <i>ras</i>	Harvey rat sarcoma gene
K- <i>ras</i>	Kirstein rat sarcoma gene
MAPK	Cinasa de la proteína activada por mitógenos
MEK (MAPKK)	Cinasas de las proteínas MAPK
N- <i>ras</i>	Neuroblastoma rat sarcoma gene
NF1	Neurofibromina 1
NGF	Factor de crecimiento neural
PAF	Poliposis Adenomatosa Familiar
PC-PCL	Proteína fosfatidilcolina fosfolipasa C
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PH	Homólogo de plecstrina
PKC	Proteína cinasa C
PT	Proteína palmitoiltransferasa
<i>ras</i>	Gen del sarcoma de rata
RFLP	Fragmentos polimórficos de restricción
RTK	Receptor con actividad de tirosina cinasa
Sos	"Son of the Seven Less"
SRF	Factor de respuesta a suero
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadenas sencillas

APÉNDICE A  
SOLUCIONES

- PBS pH 7.0

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar el pH a 7.0 con HCl. Aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O. Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

- Proteinasa K (20 mg/ ml)

Disolver 20 mg en 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Almacenar en alícuotas a -20 °C.

- Fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1)

Mezclar cantidades equivalentes de fenol equilibrado y cloroformo. Añadir 1/25 de alcohol isoamílico. Almacenar a 4°C en un frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente.

- Buffer de carga 6X para DNA

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xilencianol FF

30% de glicerol en agua

Almacenar a 4°C.

- Geles de agarosa

Agarosa

TBE 1X

Bromuro de etidio (conc. final 0.5 µg/ml)

- Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Agregar 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de H<sub>2</sub>O. Agitar varias horas para asegurar la completa disolución del reactivo. Almacenar la solución en oscuridad y a temperatura ambiente. PRECAUCIÓN: El bromuro de etidio es un agente mutagénico potente y moderadamente tóxico. Se debe manejar con guantes en todo momento.

- Geles de poliacrilamida al 12%  
12 ml de acrilamida-bis acrilamida al 40%  
TBE 10X (conc. final 1X)  
Persulfato de amonio 10%  
TEMED  
H<sub>2</sub>O (cbp 100 ml)
- Geles de poliacrilamida al 6% con 5% de glicerol  
6 ml de acrilamida-bis acrilamida al 40%  
TBE 10X (conc. final 0.5X)  
5 ml de glicerol  
Persulfato de amonio 10%  
TEMED  
H<sub>2</sub>O (cbp 100 ml)
- Geles de poliacrilamida al 6% con 7 M de urea  
6 ml de acrilamida-bis acrilamida al 40%  
42 g de urea (conc. final 7M)  
TBE 10X (conc. final 1X)  
Persulfato de amonio 10%  
TEMED  
H<sub>2</sub>O (cbp 100 ml)
- "Stop buffer" o Buffer de desnaturalización  
95% de formamida  
20 mM EDTA  
0.05% de xilencianol  
0.05% de azul de bromofenol
- TBE 10X  
108 g de Tris base  
55 g de Ácido bórico  
40 ml de EDTA (pH 8.0)  
Disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O desionizada. Esterilizar por autoclave.

APÉNDICE B  
ARTÍCULO



Date: Fri, 16 Oct 1998 10:43:33 -0400  
From: Susan Hostler <shostler@Box-s.nih.gov>  
To: pache@servidor.unam.mx  
Subject: Clinical Cancer Research Manuscript

Re: Manuscript #382070 - Analysis of ki-ras gene mutations in colorectal tumors from Mexican patients

Dear Dr. Quintero

I was pleased to receive your manuscript for publication in Clinical Cancer Research. It has been assigned the above-indicated manuscript identification number, which we ask you use in all correspondence relating to your manuscript.

It is understood that all authors listed on the manuscript have agreed to its submission and that these results have not been published elsewhere. For both original and revised submissions, we cannot guarantee that manuscripts and submission and that these results have not been published elsewhere. For both original and revised submissions, we cannot guarantee that manuscripts and illustrations will be returned to the author.

Effective January 1, 1998, a page charge of \$50 per printed page will be leveled on all manuscripts published in Clinical Cancer Research. It is understood at the time of submission that the author(s) agree to pay this charge in the event of publication. Under exceptional circumstances, when no other source of grant or other support exists, the author(s) may apply to Dr. Margaret Foti, Director of Publications, American Association for Cancer Research Publications Department (Public Ledger Building, Suite 816, 150 South Independence Mall West, Philadelphia, PA 19106-3483) at the time of submission for a waiver of the page charges. All such applications must be countersigned by an appropriate institutional official stating that no funds are available for the payment of page charges.

Thank you for your interest in Clinical Cancer Research.

Sincerely yours,

Lance A. Liotta, M.D., Ph.D.  
Senior Editor, Clinical Cancer Research  
Chief, Laboratory of Pathology  
National Cancer Institute, NIH  
Building 10, Room 2A33  
10 Center Drive, MSC 1500  
Bethesda, MD 20892-1500  
TEL: 301-402-3990 (Susan Hostler, Editorial Assistant)  
FAX: 301-402-0043

**Analysis of ki-ras gene mutations in colorectal tumors from Mexican patients.**

Segura-Uribe J.\*, Santiago-Payán H.\*\*, Sánchez R.\*\*\*, Cerbón M.A.\*, Luna P.\*\*, and Quintero A\*(♦)

\* Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,\*\* Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional S.XXI,IMSS, México D. F.,  
\*\*\*Instituto de Biotecnología, U. N. A. M., Cuernavaca, Morelos, México.

(♦) To whom correspondance should be addressed. Phone: 52-(5)6223729;

Fax 52- (5)6162010. E mail: [pache@servidor.unam.mx](mailto:pache@servidor.unam.mx)

**ABSTRACT**

An important increase in the incidence of colorectal cancer has been detected in the last decade in Mexico. This fact could be attributed to several causes, namely the diet acquired from industrialized countries. Various groups have characterized the mutational pattern of oncogenes, including Ki-ras gene in colorectal tumors from different human populations. The aim of this work was to study the percentage of mutations at codons 12, 13 and 61 of the Ki-ras gene in 40 colorectal tumors from Mexican patients. We identified point mutations at codons 12 and 13 of the Ki-ras gene, using PCR followed by RFLP. We also performed PCR-SSCP to identify mutations at codon 61. We confirmed the mutations by sequence analysis in all the altered codons. Our results indicate that 25% of the tumors presented mutations at codon 12; 8%, at codon 13; and 4%, at codon 61 of the Ki-ras gene. We found that 28.5% of these mutations presented transitions. All of them corresponded to Dukes' A & B stages of invasion. The overall results indicate that: 1) The frequency of Ki-ras mutations in colorectal cancer in Mexican population was 32.5%, which is similar to that reported in other populations. 2) Most of the studied samples were in Dukes' A & B stage and presented transitions in the second base of codon 12 whereas those mutations in codon 13 and 61 were in Dukes' C stage. 3) The prevalence of transitions detected in these patients suggests that Mexican population should be exposed to alkylating agents.

## INTRODUCTION

Colon cancer is the second most prevalent neoplasia in the western countries. A marked increase in this malignancy has been observed in Mexico in the last years (1). Alterations in cellular proto-oncogenes in colorectal neoplasias have been largely identified (2-4).

It has been reported that *Ki-ras* participates in the progression of human tumorigenesis (5-8). About half of the patients with colorectal carcinoma presents *Ki-ras* mutations (9-14). Previous reports have demonstrated the existence of different mutations in the *Ki-ras* gene at codons 12, 13 and 61 (9), (16-19).

It has been found an increase of *Ki-ras* mutations with progressive stages of the tumor suggesting the involvement of *ki-ras* activation in tumor progression (3,15).

Many *ki-ras* mutations have been associated to certain environmental carcinogens (9), such as polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic amines (16-19).

The aim of the present work was to study the frequency and the type of mutations at codons 12, 13 and 61 of *Ki-ras* gene in Mexican patients with colorectal cancer and its correlation with clinical data.

## MATERIALS AND METHODS

**Specimens and DNA preparation.** Colectomy specimens from 40 patients aged 30-86 with colorectal carcinoma were placed on ice immediately after surgical removal, opened, and rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Small portions of all carcinomas were snap-frozen and stored in liquid nitrogen until DNA preparation. All the specimens were obtained from the Hospital de Oncología, C. M. N., S. XXI, I. M. S. S. (Mexico City).

Patients were surgically treated between 1992 and 1996. All samples corresponded to sporadic colorectal adenocarcinomas, Dukes' A, B or C stages (20). High molecular weight DNA was prepared from frozen tissue using SDS lysis and proteinase K digestion as previously described (21).

**PCR-RFLP Analysis:** We used the PCR-RFLP method, with slight modifications as previously described (9). Briefly, we used PCR amplification of 0.1  $\mu$ g of DNA using the primers indicated in Table 1, 25  $\mu$ M of each deoxyribonucleotide triphosphate, 1.25 unit of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer), 20 pmol of each primer indicated in Table 1, 25  $\mu$ M of each deoxyribonucleotide triphosphate, 1.25 unit of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer), 20 pmol of each primer indicated in Table 1, The PCR amplification was performed for 30 cycles. The cycle profile was 95°C for 30 seg, 59°C for 30 seg ,72°C for 40 seg. Since the great majority of K-ras mutations reported in colorectal cancer are single base-pair mutations in codons 12 and 13, we used a sensitive mismatched primer/restriction enzyme method to specifically detect Ki-ras codons 12 and 13 mutations. Following the amplification, DNA was digested with the appropriate enzyme to detect an specific type of mutation (e. g. BstNI for mutations at codon 12). The BstNI digested products were separated onto a electrophoreses on 12% polyacrylamide gels. Ki-ras codon 12 mutations were identified by the presence of PCR products which fail to cut with BstNI; Ki-ras codon 13 mutations were identified by the presence of PCR products which fail to cut with HaeIII. The specific type of mutations were identified using sequence analysis (21).

**PCR-SSCP Analysis.** Mutations of Ki-ras at codon 61 were analyzed using the PCR-SSCP analysis as previously described in (22-23), with slight modifications. Briefly, PCR amplification of 0.1  $\mu$ g of DNA using the primers specified (Table 1): 25  $\mu$ M of each desoxyribonucleotide triphosphate, 1.25 U Taq DNA polymerase (Perkin Elmer), 20 pmol of each primer, and 2  $\mu$ Ci of ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom). The PCR reaction was performed for 30 cycles. The cycle profile was: 95°C for 30 seg, 60 °C for 40 seg, 72°C for 40 seg. Then DNA was denatured at 95°C for 6 min and analyzed on a 6% polyacrylamide gel with 5% glycerol at 3 W at 25°C. The gel was dried on filter paper and exposed to an X-ray film (Kodak X-OMAT).

**Sequencing of PCR Products.** 150-200 fmol DNA of PCR products were sequenced according to a modification of the method of Sanger (21) with the double-stranded DNA Cycle Sequencing System (Perkin Elmer) following the instructions of the suppliers. After terminating the reaction, 4 $\mu$ l were applied to a 6% polyacrylamide gel containing 7M urea and separated at 1500 V during 2 h. The gel was autoradiographed by a Kodak X-OMAT Film.

## RESULTS

The appearance of mutations in 40 colorectal tumors from Mexican patients was studied at codons 12 and 13 in Ki-ras PCR-RFLP and at codon 61 by PCR-SSCP. The sequence analysis was also carried out in order to determine the type of mutation.

### ***Mutations at the codon 12,13 and 61 of the Ki-ras gene***

PCR-RFLP analysis showed that a 25% (10/40) of the samples presented a mutation in codon 12 of the Ki-ras gene (Fig 1). The sequence analysis revealed that 30% of mutations presented a transition G to A in the first base of the codon, resulting in a change of Gly to Ser. 50% of the mutations were transition in the second base of the codon, G to A (Gly to Asp). In addition, two transversions (5%) were found. One sample presented a transversion in the second base G to C (Gly to Ala); and the other one, in the first base G to T (Gly to Cys) (Table 2).

We found that only 5% (2/40) of the samples presented a mutation at codon 13 of the Ki-ras gene. Sequencing analysis showed that both samples presented a transition in G to A in the second base of the codon (Gly to Glu).

The analysis of mutations at codon 61 showed that only 2.5% (1/40) of the tumor samples presented a change in mobility in the polyacrylamide gel. Its sequence revealed a transversion A to T that modified the encoded aminoacid Gln to His.

### ***Correlation of the Ki-ras gene mutations with the clinical data***

Clinical correlations of the data are summarized in Tables 3 and 4. The analysis of mutations in codon 12 of Ki-ras in relation to sex afforded 25% and 30% for male and female respectively. No significant correlation was found between the molecular analysis and the clinical data of the patients such as sex or location of the tumor.

We found that 70% of the samples with mutations at codon 12 were in Dukes' A & B stages. All these patients are alive without tumoral activity (AWTA). In the other three samples the stage of the tumors was not established.

The analysis of Ki-ras point mutations at codon 13 (25%) afforded two transitions GGC to GAC 2/2 (100%) (gly-glu) in both tumors which presented Dukes' C stage of invasion (Table 3) one with metastasis and the other one is dead (Table 4).

The only point mutation found in the Ki-ras codon 61 was a transversion CAA to CAT (gln to his). This tumor corresponded to a Dukes' C stage of invasion.

From the total number of mutations found (13/40), we observed 76.9% of transitions (10/13) and 23% of transversions (3/13). Thirty percent of the transitions (G to A) were found in the first base of the codon and 70% (7/10) in the second base. Besides, we observed two and one mutation in codon 13 and 61 respectively, 2/3 were transversions in the first base.

## **DISCUSSION**

The analysis of Ki-ras gene at codons 12, 13 and 61 in this study revealed that from 40 samples of colorectal cancer from Mexican patients, 32.5% presented mutations.

The frequency of Ki-ras mutation found in this work is in agreement with previous data obtained in other populations (9,10,14,15,17,18,24,25). The specific types of point mutations correlated with those observed in Japanese and USA populations, (18) which are exposed to alkylating agents. These results suggest that Mexican population is also exposed to these agents.



Our results show that 70% of the mutations in codon 12 corresponded to Dukes' A&B stages and those of codons 13 and 61 to Dukes' C stage. We found a correlation between the number of transitions in the patients without tumoral activity. These results agree with the data of Moerkerk, 1994 (17) who proposed that Duke's stage B tumors presenting G to A transitions do not progress into a higher Dukes' stage due to the absence of metastatic potential. Whereas tumors of the same stage with G-T transversions would progress toward the Dukes' stage C.

The presence of a variety of Ki-ras point mutations has been attributed to different mutagenic dietary components or ethnic variation. It is probable that transitions G to A are caused by multiple and diverse mutagens such as alkylating agents, spontaneous errors of the DNA replicative machinery or both (9), whereas G to T transversions are due to mutagenic action of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic amines (17,18).

It is important to overlook that several studies have revealed a significant difference between the type of the mutations present at Ki-ras gene and the studied population (5,6,8-10,12,16-18). Indeed the percentage of transitions found in our study (76.9% of transitions G to A) was similar to that found in the Japanese (18) and American population (9). However, in the Europeans the prevalence was different since Yugoslavian (16) and French populations (18), the major mutations were at second base of the Ki-ras gene characterized by G to T transversions. It has been reported that transversions G to T at the second base (Gly to Val) of codon 12 possess the most potent transforming ability (16). Other mutations such G to C in the first and in the second position of codon 12 (Gly to Arg and Gly to Ala, respectively) have also been reported, although the frequency is lower. However, it has been suggested that this kind of transversion endows the tumor

cells the ability of metastasing (17). This finding is very important since it may be possible to use the Ki-ras oncogene as a reliable marker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer (24).

In conclusion, our results indicate that the frequency of Ki-ras mutations in colorectal cancer was similar to that found in other populations such as the American and Japanese. The type of Ki-ras mutations in these populations occurs with the predominance of transitions. Furthermore the mutations found at codon 12 in this study were in Dukes' A & B stages, whereas those at codons 13 and 61 were transversions and corresponded to a Dukes' C stage of invasion.

Acknowledgments: we are grateful to Dr. Ignacio Camacho Arroyo for the revision and criticism of the manuscript. Julia Segura is a CONACYT fellowship, thanks to Dr. Hugo Barrera and Dra. Revol for their help in the sequencing technique. We thank Flora Garcia-Formenti of CELE, UNAM for revising of the English manuscript.

## REFERENCES

1. Mendoza-Rodríguez A., Morillón I., Cerbón M. A., Luna P., Santiago-Payán H., and Quintero A. Differential expression of c-fos, c-myc and c-Ki-ras oncogenes in colorectal cancer from mexican patients.). Bol. Estud. Méd. Biol. Méx., 44: 77-79, 1996.
2. Fearon E., Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Cell, 61: 759-767, 1990.

3. Perucho M., Forrester, C., Almoguera, C. Kahn S.L., Shibata D., Arnheim, N. and Grizzle W.E. Expression and mutational activation of c-k-ras gene in human carcinomas. *Cancer Cells*, 7: 137-141, 1989.
4. 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 colo-rectal tumor development. *New Eng. J. Med.*, 319: 525-532, 1988.
5. 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.
6. Bos J. L., Fearon E., Hamilton S., Verlaan-de Vries M., van Boom J., van der Eb J. and Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327: 293-297, 1987.
7. Shibata D., Schaeffer J., Li Z. H., Capella G., and Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-Ki-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1058-1062, 1993.
8. Ohnishi, T., Tomita, N., Monden, T., Ohue M., Yana, I, Takami, K., Yamamoto, H., Yagyu, T., Kikkawa, N., Shimano T., and Monden M. A detailed analysis of the role of K-ras gene mutation in the progression of colorectal adenoma. *British Journal of Cancer*, 75 : 341-347, 1997.
9. 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.

10. Shaw P., Tardy S., Benito E., Obrador A. and Costa J. Occurrence of *Ki-ras* and *p53* mutations in primary colorectal tumors. *Oncogene*, 6: 2121-2128, 1991.
11. L. De Benedetti, I. Varesco, N. S. Pellegata, L. Losi, V. Gismondi, L. Casarino, S. Sciallero, L. Bonelli, R. Biticchi, A. Bafico, E. Masetti, R. James, A. Heouaine, G. N. Ranzani, H. Aste, and G. Ferrara. Genetic Events in Sporadic Colorectal Adenomas: *K-ras* and *p53* Heterozygous Mutations are not Sufficient for Malignant Progression. *Anticancer Research*, 13: 667-670, 1993.
12. Pretow, T.P., Brasitus, T.A., Fulton, N. C., Cheyer, C., and Kaplan, E.L. *K-ras* Mutations in Putative Preneoplastic lesions in Human Colon *J. Natl. Cancer Institute*, 85: 2004-2007, 1993.
13. Breivik J., Meling G. I., Spurkland A., Rognum T. O. and Gaudernack G. *K-ras* mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer*, 69: 367-371, 1994.
14. LAURENT-PUIG P., OLSCHWANG S., DELATTRE O., VALIDIRE P., MELOT T., MOSSERI V., SALMON R.J. and THOMAS G. (1991). Association of *Ki-ras* mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 49: 220-223.
15. Oudjeans, J. J. Slebos, R. J. C. Zoetmulder, F. A. N., Mool, W. J. and Rodenhuis S. Differential activation of *RAS* genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int. J. Cancer*, 49: 875-879, 1991.
16. Urosevic N., Krtolica K., Skaro-Milic A., Dujic A., Knezevic-Usaj S. and Dujic A. Prevalence of G-to-T transversions among *K-ras* oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int. J. Cancer*, 54: 249-254, 1993.

17. Moerkerk P., Arends W., van Driel M., de Bruïne A., de Goeij & Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Research*, 54: 3376-3378, 1994.
18. Hayashi N., Sugai S., Ito I., Nakamori S., Ogawa M., and Nakamura Y. Ethnic difference in the pattern of K-ras oncogene mutations in human colorectal cancer. *Human Mutation*, 8: 258-261, 1996.
19. Zhuang S. M., Cochran C., Goodrow T., Wiseman R. W. and Söderkvist P. Genetic alterations of p53 and ras genes in 1,3-butadiene- and 2',3'-dideoxycytidine-induced Lymphomas. *Cancer Research*, 57: 2710-2714, 1997.
20. Dukes C. E. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 35: 323-332, 1932.
21. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 9.14-9. 23.
22. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879, 1989.
23. Nikirov Y., Nikiforova M., Gnepp D. and Fagin J. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene*, 13: 687-693, 1996.
24. Fearon E. R. K-ras mutation as a pathogenic and diagnosis marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 85: 1978-1980, 1993.

25. Gallinger S., Vivona A., Odze., Mitri A., O'Beirne C., Berk T. and Bapat B.V. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in periampullary adenomas and carcinomas from familial adenomatous polyposis patients. *Oncogene*, 10: 1875-1878, 1995.
26. Miranda, E. I., Santana C., Rojas E., Hernández S., Ostrosky-Wegman, p., Garcia-Carranca A. Induced mitotic death of Hela cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutation Research* 349, 173-182, 1996.

**FIG 1.** Analysis of mutations at codon 12 of the Ki-ras gene using PCR-RFLP. Lanes : M) Molecular weight marker (10 bp ladder); U) Undigested Normal tissue; D) BstN1 Digested Normal tissue; P) Control plasmid with a known mutation at codon 12 (26). Lanes 1-8: tumor samples digested with BstNI; Lane W): negative PCR control.

Table 1. MATERIALS AND METHODS

Analysis of mutations at codons 12, 13 and 61 of the ki-ras gene in colorectal tumors  
from Mexican patients

CODON	ANALYSIS	OLIGONUCLEOTIDES	RESTRICTION ENZYME	COMMENTS
12	PCR-RFLP	Sense 5'- TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3' Antisense 5'- GTC CTG CAC CAG TAA TAT GC-3'	Bst NI CC/(A,T)GG	Normal product was digested in: 118 and 23 bp; mutated product is not digested (141 bp)
13	PCR-RFLP	Sense 5'- GCC TGC TGA AAA TGA CTG AA-3' Antisense 5'- CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAG G-3'	Hae III GG/CC	Normal product was digested in 49 and 22 bp. Mutated product is not digested. (71 bp)
61	PCR-SSCP	Sense 5'-TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG -3' Antisense 5'- CAC AAA GAA AGC CCT CCC CA -3'	-----	Conformational changes were analyzed by sequencing to confirm mutations



Table 2. Analysis of Ki-ras mutations at codons 12, 13 and 61  
in Mexican population

No. of samples (%)	Codon (GGT) 12	Codon (GGC) 13	Codon (CAA) 61	AA changed
3/40 (7.5%)	AGT	---	---	Gly→Ser transition
5/40 (12.5%)	GAT	---	---	Gly→Asp transition
1/40 (2.5%)	TGT	---	---	Gly→Cys transversion
1/40 (2.5%)	GCT	---	---	Gly→Ala transversion
2/40 (5%)	---	GAC	---	Gly→Glu transition
1/40 (2.5%)	---	---	CAT	Gln→His transversion

Table 3. Correlation of Ki-ras mutations in colorectal tumors with  
clinical data.

	No. of tumors	Percentage of mutations (%)	Codon 12 GGT	Codon 13 GGC	Codon 61 CAA
Sample size	40	32.5	10	2	1
Sex of patient					
Male	20	25	4	1	0
Female	20	40	6	1	1
Location of the tumor					
Right	8	37.5	2	1	0
Left	32	31.25	8	1	1
Dukes' stage*					
A	2	50	1 (Ts)	0	0
B	21	28.5	5(Ts) 1(Tv)	0	0
C	12	25	0	2(Tv)	1
D	1	0	0	0	0
ND	4	75	3	0	0

\* Dukes' stage classification. ND: Dukes' stage not determined. Ts transitions; Tv, transversions.

Table 4. Correlation analysis of transitions and transversions of Ki-ras mutations at codons 12, 13 and 61 with Dukes' stage and survival in Mexican population

	transition/ transversions	Dukes' stage A&B/C	Survival (AWTA*)
Total	10/3	7/3	8
codon 12	8/2	6/0	6
codon 13	2/0	0/2	0
codon 61	0/1	0/1	1

\* Without tumoral activity (AWTA)