



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL ONCOGEN BRAF EN  
TUMORES DE TIROIDES**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**KARLA MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ MALDONADO**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida, la culminación de mi carrera con la presentación de esta tesis de licenciatura.

Agradezco con todo el corazón a mis padres, por su amor, esfuerzo, paciencia y dedicación para formarme como una mujer exitosa. Por brindarme su apoyo incondicional y confiar en mí. Por brindarme la oportunidad de tener los estudios que me han permitido llegar al término de ésta licenciatura. Gracias por estar en las buenas y en las malas, por sus sabios consejos y sus regaños cuando fueron necesarios. Por ser un ejemplo a seguir. Finalmente quiero que sepan que este éxito es de ustedes, ya que sin ustedes no lo hubiera logrado. Los quiero mucho y gracias por lo más valioso que me han brindado, la educación y el conocimiento, que a través de estos años he adquirido en la casa y en la escuela.

A mis hermanos, Gaby y Carlos, y a mi sobrino Santiago por su amor, paciencia y por entender el que a veces no estuviera con ustedes por las exigencias de esta carrera. Gaby y Carlos, gracias por todo el apoyo que me han brindado incondicionalmente a través de estos años, por aguantar mis estados de ánimo y mis ausencias en épocas de exámenes y fines de semestre.

A toda mi familia por el amor, confianza y el apoyo que me han brindado a través de todo este tiempo.

A Francisco Javier, por llegar a mi vida, por apoyarme en la realización de este trabajo, por su amor, consejos, paciencia y comprensión. Gracias por estar a mi lado ya que sin ti esto no habría sido lo mismo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios a nivel licenciatura y por los recursos proporcionados durante mi estancia en esta máxima casa de estudios.

A mi tutor, Dr. Jorge Meléndez por permitir la realización de este trabajo de tesis de licenciatura en su laboratorio, por sus consejos, dirección y apoyo brindado. Gracias, ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Vilma Maldonado por el apoyo brindado durante la realización de ésta tesis.

A la Dra. Gisela Ceballos, por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, por sus consejos y comentarios en el laboratorio. Gracias por el tiempo invertido en la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmen Giral y a la M. en C. Alicia Cervantes por contribuir en la revisión y evaluación de este trabajo de licenciatura.

A mis amigos: Pepe, Andrea, Alejandro, Donají, Jonathan, Araceli, Mariana, Eric, Ernesto y Rosa por su amistad, apoyo, confianza y cariño que me brindaron durante nuestra estancia en la carrera, gracias por los momentos de alegría, tristeza, estrés y diversión que pasamos juntos. Por sus consejos, por los disgustos que pasamos y por la superación de cada uno de los problemas que se presentaron. Gracias por haberse cruzado en mi camino. Los quiero mucho.

A todos mis compañeros del laboratorio: Ángela, Paola, Carla, Gustavo, Iván, Lorena, Adriana, Román, Luz y Sergio, por su apoyo, consejos y por los momentos que hemos pasado durante la realización de este trabajo.

Finalmente y no por eso menos importantes a todas las personas que estuvieron en algún momento en mi vida y me apoyaron cuanto pudieron.

*“El principio más fuerte de crecimiento humano  
radica en la elección”.*  
Mary Ann Evans

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
a. Cáncer de tiroides.....	3
b. Vía de las MAP cinasas.....	4
c. Gen <i>BRAF</i> .....	7
d. Mutaciones en <i>BRAF</i> .....	8
III. HIPÓTESIS .....	11
IV. OBJETIVOS.....	11
a. General.....	11
b. Específico.....	11
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	12
a. Procesamiento de muestras.....	12
b. Extracción de DNA con Trizol®.....	12
c. Extracción de DNA genómico con estuche comercial .....	13
d. MASA-PCR y PCR .....	14
e. Secuenciación automatizada.....	16
VI. RESULTADOS .....	17
a. Procesamiento de las muestras .....	17
b. Extracción de DNA con Trizol.....	17
c. Extracción de DNA genómico con estuche comercial .....	18

<b>d.</b> MASA-PCR .....	19
i. Estandarización de la técnica.....	19
ii. Evaluación de <i>BRAF</i> en líneas celulares .....	21
iii. Evaluación de <i>BRAF</i> en muestras de cáncer de tiroides.....	22
<b>e.</b> Secuenciación automatizada del exón 15 de <i>BRAF</i> .....	24
VII. DISCUSIÓN.....	32
VIII. CONCLUSIONES.....	38
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	40
X. APÉNDICE.....	44
i. ABREVIACIONES .....	46
ANEXO.....	47

## I.- INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales caracterizadas principalmente por un conjunto de alteraciones genéticas que promueven una desregulación en el crecimiento, muerte y diferenciación celular. Las células tumorales se caracterizan por ser autosuficientes en las señales de crecimiento e insensibles a las señales inhibitorias de crecimiento, así como por evadir la muerte celular programada (apoptosis), poseer un potencial replicativo ilimitado, presentar angiogénesis sostenida e invadir tejidos cercanos y/o distantes promoviendo así la metástasis.<sup>1</sup> Además, las células cancerosas adquieren resistencia a los fármacos y evitan la senescencia inducida por oncogenes.<sup>2</sup> Dentro de este conjunto de enfermedades se encuentra el cáncer de tiroides, el cual representa el 1% de todas las neoplasias. Uno de los tipos histológicos de esta neoplasia es el carcinoma papilar de tiroides o PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*, por sus siglas en inglés), el cual se caracteriza por presentar una mutación puntual en el oncogén *BRAF*. Esta mutación es una transversión de timina a adenina en el nucleótido 1799, que se traduce en un cambio de valina a glutamato en el residuo de aminoácido 600 de la proteína codificada por *BRAF*. A nivel molecular, el gen *BRAF* codifica para una proteína perteneciente a la familia de las MAP cinasas o MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, por sus siglas en inglés). Los genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía de las MAP cinasas se han visto implicadas en la progresión de algunos tipos de cáncer, como es el caso de la transformación neoplásica presente en el PTC.<sup>3</sup>

Existen diversas técnicas para la detección de mutaciones específicas, como son la amplificación genómica por PCR, seguida del análisis del polimorfismo de la conformación de cadena sencilla (SSCP) y la validación de los resultados por secuenciación. Así como, la amplificación del alelo específico en tiempo real, la detección de la mutación por colorimetría y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En el año 2006 desarrollaron una metodología

basada en la amplificación específica del alelo mutado denominado MASA (Mutant allele specific amplification) por PCR, para detectar mutaciones puntuales como la transversión T1799A en el oncogén *BRAF*.<sup>4</sup>

Debido al aumento en la incidencia y prevalencia del cáncer de tiroides en los últimos años así como a la falta de estudios en México sobre esta enfermedad, se propuso estudiar la mutación T1799A en muestras de tejido tiroideo de individuos con cáncer de tiroides, obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología, las cuales fueron analizadas empleando la técnica de MASA-PCR para la detección de *BRAFV600E*.

Resultados. Se extrajo el DNA genómico de células HeLa, homocigota para *BRAF*<sup>+</sup> y de células HT29, heterocigota para *BRAF*, así como de una línea celular extraída en el laboratorio denominada Ty1 y de trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides. Se evaluó la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* por medio de la técnica de MASA-PCR, en donde obtuvimos que el alelo silvestre se presentó en las trece muestras de tejido tiroideo de pacientes con cáncer de tiroides y el alelo mutado se presentó sólo en once de ellas, es decir, en 84.7% de las muestras. Para confirmar los resultados, se empleó la técnica de secuenciación automatizada, la cual detectó la presencia de *BRAFV600E* en un 53.8% de un total de 13 muestras.

## **II.- MARCO TEÓRICO**

### **a) *Cáncer de Tiroides***

El instituto Nacional de Cáncer de E.U.A clasifica al cáncer de tiroides de acuerdo a su histología en dos subgrupos: los tumores diferenciados (papilar o folicular) y los tumores poco diferenciados (medular y anaplásico), siendo los primeros mas frecuentes, tratables y generalmente curables y los segundos menos comunes, agresivos, metastásicos y con un pronóstico más precario.

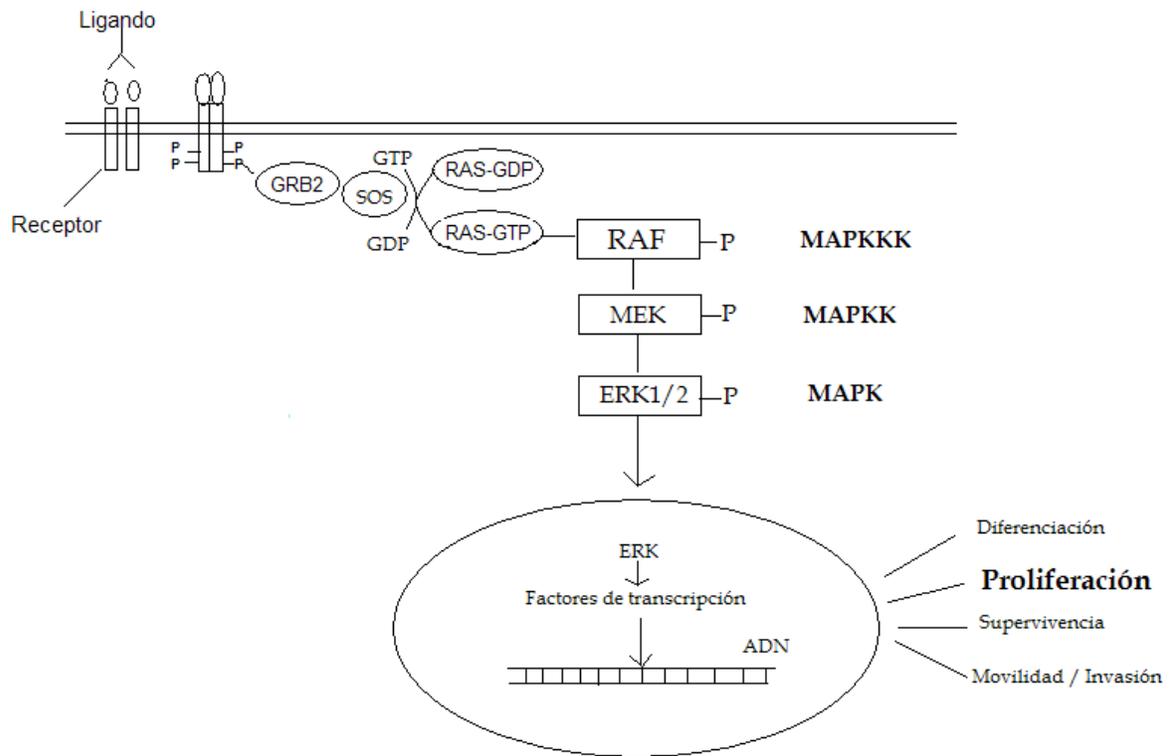
En el presente trabajo nos enfocaremos al carcinoma papilar de tiroides o PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*, por sus siglas en inglés), el cual ha sido definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un “tumor maligno epitelial que evidencia diferenciación de célula folicular, típicamente con estructuras papilares y foliculares así como cambios nucleares característicos (aspecto esmerilado, pálido y/o vacío, tamaño grande, contorno irregular, hendiduras profundas, nucléolo pequeño y pseudoinclusiones).<sup>5</sup> El PTC es el tipo de cáncer tiroideo más común de todas las neoplasias endócrinas, representando aproximadamente el 80% de todos los casos.<sup>3</sup> En el año 2004 se reportó que el cáncer de tiroides representaba una de las ocho neoplasias más comunes en la mujer,<sup>6</sup> siendo el 3% de todos los cánceres en este género. Esta prevalencia se ha duplicado en 15 años a la fecha, cuando el PTC representaba el 1.7% de todos los cánceres. La incidencia de esta neoplasia se ha incrementado más rápidamente que otras: 3.8% por año en el período 1992-2001. Hoy en día, la incidencia del cáncer de tiroides está entre 5 y 8 casos por cada 10<sup>5</sup> habitantes por año en países desarrollados. Además, en el género masculino, la mortalidad por cáncer de tiroides se ha incrementado más rápidamente que cualquier otro tipo de cáncer, es decir el 2.3% por año en el periodo comprendido de 1992 a 2001.<sup>7</sup>

## b) Vía de señalización de las MAP cinasas

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de proteínas intracelulares cuya actividad está regulada por la fosforilación de su dominio de activación, en la región conservada en los residuos de aminoácido treonina y tirosina.<sup>8</sup> Estas proteínas cinasas modulan las señales extracelulares para el control del crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis en la célula.<sup>9</sup> Estas cinasas fosforilan una gran cantidad de proteínas, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, cinasas y otras enzimas, así como también influyen en la expresión de genes, metabolismo, división, morfología y supervivencia celular.<sup>10</sup>

En las células animales hay cinco familias identificadas como MAPK, las cuales son: las cinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2 (por sus siglas en inglés, Extracellular signal-Regulated Kinases); cinasa de Jun en la región N-terminal (JNK1 JNK2 Y JNK3); Isoenzima p-38 cinasa (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ ); ERK3/ERK4 y ERK5.<sup>10</sup> La vía más estudiada es la de ERK1/ERK2, cinasas que regulan la proliferación, diferenciación y meiosis, así como el aprendizaje y memoria de las células nerviosas, éstas proteínas son activadas por estímulos mitogénicos como los factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, estrés físico y ésteres de forbol (activa a la proteína cinasa C), los cuales además activan una gran variedad de receptores y proteínas G. La cascada de señalización consta de 3 niveles proteicos; la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK), que fosforila a la MAP cinasa cinasa (MAPKK, MAPK2, MEK o MKK) y ésta a su vez fosforila a la MAP cinasa (MAPK). La fosforilación se lleva a cabo en sitios específicos, en respuesta a un estímulo, siendo éste, la interacción del ligando con su receptor, con actividad de tirosina-cinasa, el cual se encuentra en la membrana y al fosforilarse por acción del ligando forma un complejo activando a las proteínas de *GRB2* y *SOS*, que interactúan con la forma inactiva de *RAS* (*RAS*-GDP), activa a *RAS* por fosforilación y forma el complejo *RAS*-GTP, con ello la activación de las MAPKKK.

En el presente trabajo la proteína del gen *RAF* es la MAPKKK, que se encuentra inactiva como *RAF-GDP* y al fosforilarse los dominios largos reguladores forma el complejo activo *RAF-GTP*. Por otro lado, las MAPKK (MEK1/2) tienen dominios pequeños regulatorios, que son activados por fosforilación dual en los residuos de serina y treonina dentro del asa de activación del dominio catalítico. Finalmente, las MAPK (ERK) son activadas por fosforilación dual de los residuos conservados de treonina y tirosina, dentro del dominio de activación y fosforilan blancos en los residuos de serina/treonina dentro de un motivo consenso PXT/SP, en donde X depende de la MAP cinasa.<sup>10</sup> (Figura 1).



**Figura 1.-** Activación de la Vía de señalización de las MAP cinasas asociada al receptor con actividad tirosina cinasa. (Imagen modificada de la Ref. 11)

ERK1/ERK2 tienen muchos blancos conocidos, incluyendo factores de transcripción clave, como AP-1, NF- $\kappa$ B, Myc, cinasas como Rsk, el regulador de supervivencia de la célula Bcl-2 y cPL2. Dependiendo de la intensidad y la duración del estímulo, las MAP cinasas ERK1/ERK2 activas pueden regular la proliferación o la diferenciación celular.<sup>10</sup> Se sabe que la activación constitutiva de las MAP cinasas promueve la desregulación de la vía. Esta actividad constitutiva se encuentra presente en un tercio de todos los cánceres. Una alta frecuencia de desregulación en la vía de las ERK se debe a mutaciones de *RAS* y *RAF*.<sup>9</sup>

*RAS* frecuentemente está mutado en muchos tumores y asociado a la activación constitutiva de ERK1/ERK2, promoviendo la proliferación de la célula tumoral.<sup>10</sup> La hiperactivación de la vía de señalización provoca una proliferación desregulada y la transformación neoplásica celular en modelos biológicos, esto ocurre comúnmente en los tumores humanos.<sup>12</sup>

### c) Gen *BRAF*

En la base de datos de Entrez Gene y Ensembl se encontraron algunas características genéticas importantes de *BRAF* las cuales se muestran en la siguiente tabla. (Tabla 1)

**Tabla 1.-** Características genéticas del gen *BRAF*

Nombre(s)	Proto-oncogén B-Raf proteína serina/treonina cinasa homologo B1 del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
Localización	7q34
Numero de exones	18
Longitud del transcrito	2477 pb
Longitud de la proteína	766 aa

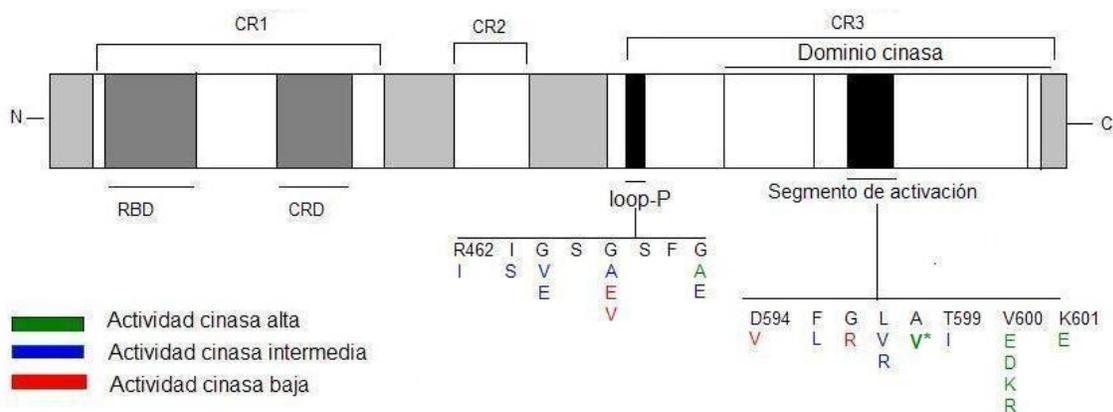
Ensembl

*RAF*, por sus siglas en ingles Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, fue descubierto hace dos décadas por dos grupos de investigación independientes, como un oncogén retroviral, v-Raf o v-MIL, que poseía actividad cinasa de serina/treonina. Esta actividad cinasa serina/treonina posteriormente fue encontrada de manera lineal en la cascada de señalización de las MAP cinasas<sup>13</sup> (Figura 1). En los mamíferos, el gen *RAF*, que codifica para proteínas con actividad cinasa de serina/treonina, comprende tres miembros: *CRAF* (*RAF1*), *ARAF* y *BRAF*.

Las isoenzimas de *RAF* tienen una estructura similar, tienen tres regiones altamente conservadas: CR1, CR2 y CR3, en donde CR1 y CR2 tienen un sitio de

unión a *RAS* denominado RBD (por sus siglas en inglés, Ras binding domain) y una región rica en cisteína denominada CRD (*Cysteine Rich Domain*, por sus siglas en inglés). La región CR3 contiene el dominio cinasa, siendo éste el sitio de activación de la proteína y en donde se va a encontrar la mutación puntual de *BRAFV600E* Figura 2.<sup>14</sup> El miembro más estudiado de la familia de *RAF* es la isoforma *CRAF* (*RAF-1*), el cual se ha visto cooperando con otros oncogenes como *MYC* y *RAS* en la transformación celular, así como en los casos de los genes supresores de tumores *p53* y *Rb*. *CRAF* se caracteriza por ser un complejo de regulación que se une a *RAS* activado. La activación de CRaf requiere de la fosforilación de serina 338/339 y tirosina 340/341 en la región amino terminal del dominio cinasa. ARaf parece ser regulado de la misma forma que CRaf.<sup>13</sup>

La regulación de *BRAF* parece ser más sencilla, con la unión a *RAS* y la activación del dominio fosforilado en T599 y S602 es suficiente para la activación completa.<sup>15</sup>



**Figura 2.-** Representación esquemática de las regiones conservadas de *RAF* y del dominio cinasa, así como también el tipo de actividad cinasa de las mutaciones presentes en *BRAF*. RBD se refiere al sitio de unión a Ras (por su nombre en inglés, Ras Binding Domain), CRD se refiere al sitio rico en cisteínas CR1, CR2 y CR3, que son las regiones conservadas entre las tres isoformas de *RAF*. (Imagen modificada de Ref.19 y modificada con Ref. 3)

#### d) Mutaciones en *BRAF*

En el PTC se han encontrado diversas mutaciones en los genes que codifican para diferentes proteínas como por ejemplo en el gen *RET*. Los re-arreglos más comunes en este gen son una inversión paracéntrica en *RET/PTC1* y un re-arreglo intracromosómico en *RET/PTC3*. Además, se han encontrado mutaciones puntuales en los genes de *RAS*, *KRAS*, *HRAS* y *NRAS*, y la mutación puntual más importante, en el codón 600 del gen *BRAF*.<sup>16</sup>

En el año 2002, detectaron en *BRAF* tres sustituciones de una sola base, dos en el exón 15, una en T1796A (V599E) en la línea celular de melanoma (Colo-829) y la otra en C1786G (L596V) en las células no pequeñas de cáncer de pulmón (NCI-H2087). Una en el exón 11, en G1403C (G468A) en la línea celular NCI-H1395.<sup>17</sup>

Las mutaciones puntuales en *BRAF* han sido encontradas en aproximadamente un 45% de los PTC y en un 70% de los melanomas. En casi todas las mutaciones de los PTC's y aproximadamente en el 80% de las de melanoma, la mutación es una transversión T>A en el nucleótido 1799 (anteriormente 1796, por un error en la secuenciación),<sup>14</sup> resultando en la sustitución de valina por glutamato en el residuo de aminoácido 600 de la proteína (antes 599). El codón que contiene la mutación está situado entre los residuos de aminoácido T599 y S602. Se cree que la mutación V600E imita la fosforilación T599/S602, generando la activación constitutiva de *BRAF*.<sup>18</sup> Esto se debe a que en la proteína desfosforilada, *BRAF*<sup>+</sup>, las interacciones hidrofóbicas entre el dominio de activación y el sitio de unión a ATP, mantienen a la proteína en su conformación inactiva, en donde la sustitución V600E interrumpe esta interacción y permite la formación de una nueva interacción que mantiene a la proteína en su forma activa, resultando en una fosforilación continua de MEK.<sup>16</sup>

En el año 2004, clasificaron a las mutantes de *BRAF* en tres grupos de acuerdo a su actividad cinasa *in vitro* como actividad alta, intermedia y baja. El grupo de alta actividad supera de 100-700 veces la actividad normal de *BRAF*, siendo la mutación V600E 460 veces más activa. El grupo intermedio activa a *BRAF* de 1 a

10 veces más y el grupo de baja actividad tiene menor actividad que *BRAF* no oncogénico (Figura 2). Esta variación tan grande entre las mutantes de las proteínas con actividad cinasa codificadas por *BRAF* no se traduce en la actividad de ERK, sin embargo se ha planteado que el grupo de actividad cinasa alta e intermedia incrementa la actividad de ERK en 2 a 4.6 veces. La mutación oncogénica en *BRAF*, ya sea en el dominio P o en el dominio de activación, desestabiliza esta interacción y altera la conformación inactiva.<sup>19</sup>

La mutación en *BRAFV600E* rara vez se encuentra sobrelapada con mutaciones en *RAS* y esto sugiere que estas alteraciones genéticas en *BRAF* son suficientes para activar los efectores comunes “rio abajo” para la transformación de las células.<sup>20</sup>

En el 2007, reportaron que las mutaciones en *BRAF* se han detectado en 70% de melanomas, 30% de cánceres de tiroides, 15% de cáncer de colon y en menor frecuencia en otros tipos de cáncer.<sup>13</sup> El 11% de las mutaciones en *BRAF* se encuentran en la región rica en glicina (exón 11) y un 89% en el segmento de activación (exón 15).<sup>22</sup> La mutación en el segmento de activación, en *BRAFV600E*, genera la actividad cinasa constitutiva. Las consecuencias funcionales de esta activación constitutiva y la subsecuente fosforilación de sus blancos son incrementar la proliferación, diferenciación, supervivencia celular, inmortalización y angiogénesis.

### **III.- HIPÓTESIS**

Si se encontrara expresado el alelo *BRAFV600E* en muestras de cáncer de tiroides, entonces la neoplasia corresponderá a la variante papilar.

### **IV.- OBJETIVOS**

#### **a) General**

Evaluar la presencia de la mutación puntual en *BRAF V600E* por medio de la técnica de MASA-PCR, en muestras de pacientes mexicanos con cáncer de tiroides.

#### **b) Específicos**

1. Extraer el DNA genómico de líneas celulares tumorales y muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer tiroideo.
2. Estandarizar la técnica de MASA-PCR para la detección de la mutación V600E en *BRAF* en líneas celulares y muestras de pacientes.
3. Analizar la presencia de la mutación de *BRAF* por medio de la técnica de secuenciación automatizada.
4. Realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante las técnicas de MASA-PCR y secuenciación para la detección de la mutación en *BRAFV600E*.

## **V.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

### Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo fueron: células de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), células de cáncer de tiroides (Ty1, aislada en el laboratorio) y células de adenocarcinoma colorectal (HT29). Las células se cultivaron a 37°C en DMEM suplementado con SFB al 5%, en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **a) Procesamiento de muestras de pacientes**

Las muestras de los pacientes fueron proporcionadas por el Dr. José Federico Carrillo del Instituto Nacional de Cancerología, las cuales fueron recopiladas en el periodo comprendido de junio 2008 a marzo 2009. Las muestras fueron preservadas en congelación con nitrógeno líquido. Una pequeña porción del tejido se utilizó para la estandarización de la técnica de MASA-PCR para evaluar su sensibilidad. Todas las muestras, de acuerdo al reporte médico, correspondían a la variante papilar, en estadio avanzado.

#### **b) Extracción de DNA con Trizol®.**

Para las líneas celulares se siguió la metodología que a continuación se describe brevemente. Se desprendió la monocapa de células de la caja de cultivo y fueron homogenizadas con Trizol®, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase orgánica se precipitó con etanol, se separó el sobrenadante y el precipitado se lavó con citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10%. Se centrifugó y descartó nuevamente el sobrenadante, para así solo dejar el precipitado y después se resuspendió el botón de células en una solución de NaOH 8mM (Anexo). Se cuantificó el DNA obtenido mediante espectrofotometría de UV-Visible, con el equipo NanoDrop ND-1000. Las longitudes de onda que se utilizaron fueron: 260

nm y 280 nm, a las cuales se detectan, ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. La pureza del DNA se evaluó con la relación 260/280, la cual debe ser de ~1.8, un valor menor indica que hay contaminación ya sea con fenol, proteínas u otros contaminantes que absorben a la longitud de onda de 280 nm.

Para las muestras de pacientes, se tomaron aproximadamente 25 mg del tejido de tiroides, el cual fue cortado en pedazos pequeños, seguido de esto fueron homogenizadas con Trizol® y se agregó cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), se centrifugó y la fase orgánica se trató como se mencionó anteriormente para la extracción de DNA, a partir de líneas celulares. Seguido de la extracción de DNA se cuantificó y se verificó su pureza con la relación 260/280.

### **c) Extracción de DNA genómico con QIAamp® ADN Mini Kit**

A partir de las líneas celulares antes mencionadas se extrajo DNA genómico de acuerdo a las instrucciones del fabricante del estuche comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). Brevemente, las células previamente lisadas con un regulador de lisis alcalina fueron colocadas en una columna que contenía una membrana de silica-gel a la cual se adhiere el DNA por carga, posteriormente mediante centrifugación y el uso de otros reguladores se desecharon los restos celulares, proteínas y al RNA. Finalmente se eluye el DNA con agua MilliQ. El DNA genómico obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría.

Para la extracción del DNA genómico de muestras de tejido de pacientes con cáncer de tiroides, se tomaron aproximadamente 25 mg del tejido y fue cortado en pedazos pequeños, se agregó proteinasa K para llevar a cabo la lisis del tejido y se dejó incubando toda la noche a 56 °C con agitación cada 30 minutos durante 10 segundos a 400 rpm. Seguido de la lisis se realizó la extracción del DNA siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó mediante espectrofotometría.

#### **d) MASA-PCR y PCR**

Se llevó a cabo la amplificación de BRAF<sup>+</sup> y BRAFV600E tanto en líneas celulares como en las trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides mediante la técnica de MASA-PCR (Mutant Allele-Specific PCR Amplification), así como también la amplificación del exón 15 mediante PCR convencional. Se utilizó el DNA genómico (100 ng) como templado, en una mezcla de reacción de PCR de 25  $\mu$ L. Brevemente, la amplificación específica de un alelo mutado ó MASA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó con iniciadores específicos para la mutación, esta reacción comenzó con la activación de la enzima a 95°C 10 min, después se llevó a cabo la desnaturalización del DNA a 95°C 30'', lo que dió lugar a moléculas de DNA de cadena sencilla. Los iniciadores se hibridaron con sus secuencias complementarias al DNA de cadena sencilla a una temperatura de 58°C 30''. La DNA polimerasa replicó los segmentos de DNA de cadena sencilla en dirección 5'-3' partiendo del iniciador a una temperatura de 72°C 30'' para la extensión de la cadena para completar un ciclo. Esta reacción se lleva a cabo durante varios ciclos para lograr la amplificación del gen en estudio.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla 2. Para cada una de las reacciones de PCR se utilizaron un par de iniciadores específicos, la secuencia de los iniciadores se menciona en la tabla 3. Cabe señalar que el iniciador anti-sentido de BRAF es el mismo para la detección del alelo silvestre y del mutado.

Las condiciones del MASA-PCR que se utilizaron fueron las mismas en cuanto a las temperaturas, antes mencionadas. El número de ciclos fue variable, para la presencia del gen BRAF en líneas celulares, la reacción se llevó a cabo durante 35 ciclos y para la estandarización y evaluación de la técnica de MASA en las muestras de tiroides, se llevó a cabo durante 35, 40 y 45 ciclos. La amplificación del exón 15, se realizó por PCR convencional, ésta se llevó a cabo durante 35 ciclos, las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C 10 min, 35 x (95°C 30'', 58°C 30'', 72°C 30''), 72°C 5 min.

**Tabla 2.-** Reactivos utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR para la evaluación de la detección de BRAF

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad y concentración</b>
DNA	<b>100 ng</b>
iniciadores específicos	<b>0.4 <math>\mu</math>M</b>
dNTP	<b>200 <math>\mu</math>M</b>
Regulador de MgCl <sub>2</sub>	<b>25 <math>\mu</math>M</b>
Taq polimerasa	<b>2.5 unidades</b>
Agua MilliQ	<b>cbp 25 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 3.** Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de BRAF silvestre, BRAF mutado y del exón 15 de BRAF, así como también el tamaño del producto de PCR esperado.

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>	<b>Fragmento pb</b>
<b>BRAF<sup>+</sup> S</b>	5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3'	125
<b>BRAF AS</b>	5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'	
<b>BRAFV600E S</b>	5'-GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'	125
<b>BRAF AS</b>	5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'	
<b>Exón 15 S</b>	5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'	224
<b>Exón 15 AS</b>	5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'	

### **e) Secuenciación automatizada**

Los productos de PCR, resultado de la amplificación del exón 15 tanto de líneas celulares como de las trece muestras, fueron purificados con el estuche comercial QIAquick PCR purification (QIAGEN) y posteriormente se enviaron a secuenciar. El secuenciador que se empleó fue de alto rendimiento, modelo 3730XL de 96 capilares de Applied Biosystems. El software que se utilizó para el análisis de los resultados fue el Sequencer scanner v3.1 de Applied Biosystems.

La concentración de DNA en las muestras necesaria para la secuenciación fue de 4-20 ng/ $\mu$ L. El iniciador que se utilizó para secuenciar 11 de las 13 muestras fue el correspondiente al exón 15 sentido y para las muestras restantes se utilizó el iniciador exón 15 antisentido. La secuenciación del exón 15 se realizó en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

## **VI.- RESULTADOS**

### **a) Procesamiento de las muestras**

Se cortaron fragmentos pequeños de diversas regiones del tejido tiroideo, se pesaron para obtener 25 mg del tejido y se lisaron con la solución de lisis contenida en el estuche comercial durante toda la noche. Al día siguiente se siguió la metodología antes descrita para la extracción de DNA genómico.

### **b) Extracción de DNA con Trizol®**

La cuantificación del DNA obtenido con Trizol de las células Ty1 y de dos muestras de tiroides se muestra a continuación en la tabla 4. Para la cuantificación del DNA se empleo el NanoDrop ND 1000, como se mencionó anteriormente.

**Tabla 4.-** Cuantificación de DNA obtenido de células Ty1 y muestras de tiroides

<b>Muestra</b>	<b>ng/uL</b>	<b>Pureza 260/280</b>	<b>µg DNA totales</b>
<b>Ty1</b>	741.9	1.95	14.82
<b>6</b>	51.6	1.92	25.8
<b>9</b>	13.0	0.41	6.5

Para mejorar la pureza y cantidad obtenida del DNA a partir de muestras de tejido de cáncer de tiroides, se decidió realizar la extracción del DNA con el estuche comercial QIAamp® ADN Mini Kit (QIAGEN), tanto para las muestras como para líneas celulares.

### c) Extracción de DNA genómico con QIAamp® DNA Mini Kit

A partir de la extracción del DNA genómico de líneas celulares con el estuche comercial, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.-** Cuantificación del DNA extraído de las células HeLa, Ty1 y HT29

<b>Muestra</b>	<b>ng/μL</b>	<b>Pureza 260/280</b>	<b>μg DNA Totales</b>
<b>HeLa</b>	275.7	2.10	55.14
<b>Ty1</b>	121.7	2.05	24.34
<b>HT29</b>	82.1	2.10	16.42

De la extracción del DNA genómico de las trece muestras de tejido tiroideo con el estuche comercial se obtuvieron los siguientes resultados. Tabla 6.

**Tabla 6.-** Cuantificación de DNA genómico de trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides y verificación de la pureza del DNA obtenido.

<b>Muestra</b>	<b>Peso de la muestra mg</b>	<b>Pureza 260/280</b>	<b>ng DNA/μL</b>	<b>μg DNA totales</b>
<b>1</b>	22.4	1.94	31.0	6.2
<b>2</b>	25.0	1.92	51.6	25.8
<b>3</b>	27.9	2.01	146.5	29.3
<b>4</b>	25.2	2.12	82.6	16.52
<b>5</b>	28.9	1.99	68.5	13.7
<b>6</b>	25.0	2.04	56.4	11.28
<b>7</b>	27.2	2.03	109.5	21.9
<b>8</b>	27.7	1.84	84.3	16.86
<b>9</b>	31.9	1.52	12.2	2.44
<b>10</b>	25.8	1.98	124.5	24.9
<b>11</b>	26.0	1.90	82.9	16.58
<b>12</b>	27.4	1.96	62.9	12.58
<b>13</b>	25.4	1.94	56.8	11.36

## d) MASA-PCR y PCR

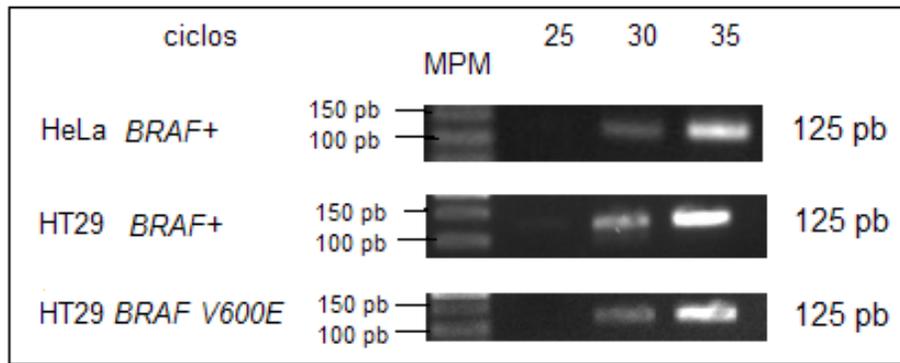
### i. Estandarización de la técnica

Para determinar la presencia de *BRAF*<sup>+</sup>, el iniciador sentido se alineó dentro del exón 15 y el iniciador *BRAF* anti-sentido se alineó en el Intrón 14, dando como resultado la amplificación de un fragmento de 125 pb. Figura 3.

```
ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTGGTCTAGCT
ACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGAT
CCATTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTCCACTGATTAAATTTTGG
CCCTGAGATGCTGCTG
```

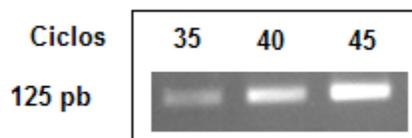
**Figura 3.-** Secuencia de la región en donde reaccionan los iniciadores, las letras resaltadas representan al exón y la letras con formato normal representa al intrón. Las regiones subrayadas y sombreadas representan a los iniciadores sentido y anti-sentido, siendo el anti-sentido el de letra cursiva.

Se llevó a cabo la estandarización de la reacción de PCR para la detección de *BRAF*, se realizó una curva de saturación con las células HeLa y HT29, las condiciones de PCR fueron 95°C 10 min, 35x(95°C 30", 58°C 30", 72°C 30"); 72°C, 5 min y se tomaron alícuotas a los 25, 30 y 35 ciclos para determinar el grado de saturación. Para observar los resultados se llevó a cabo la electroforesis en geles de agarosa al 2%. No se observó la presencia de *BRAFFV600E* en células HeLa debido a que estas células son homocigotas para el alelo silvestre. Los resultados se muestran en la Figura 4



**Figura 4.-** Resultado de la electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los productos de amplificación de la estandarización de la reacción de PCR para la detección de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAF V600E* en células HeLa y HT29.

Se realizó la estandarización de la técnica de MASA-PCR en las muestras de tiroides para evaluar la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFFV600E*, se utilizaron las mismas condiciones de PCR que se utilizaron para las líneas celulares, con la variante en el número de ciclos, ya que para las muestras de tejido tiroideo se realizó la PCR durante 45 ciclos. Se tomaron alícuotas a los 35, 40 y 45 ciclos para determinar el grado de saturación de la reacción y permitir la estandarización del PCR. Para observar la presencia de *BRAF* se empleó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. La figura 5 es representativa de la estandarización de la PCR para cada una de las muestras.



**Figura 5.-** Imagen de los productos de la amplificación para la estandarización de la PCR en la muestra 7 de paciente, para la detección de *BRAFFV600E*

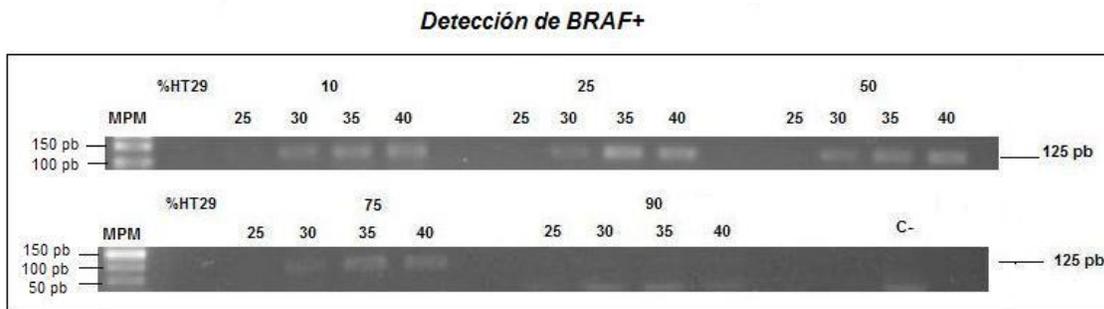
## ii. Evaluación de BRAF en líneas celulares

Para la detección de *BRAF* en una mezcla de líneas celulares, se requirió de una línea celular homocigota para el alelo silvestre y una línea celular para el alelo mutado, debido a que en el laboratorio no se contó con una línea celular homocigota para *BRAFV600E*, se empleó una línea celular heterocigota, HT29. En base a lo anterior se evaluó la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* en la mezcla de líneas celulares, HeLa y HT29, por medio de la técnica de MASA-PCR con los iniciadores mencionados anteriormente. (Tabla 3) Esto se realizó para determinar si había diferencia en la amplificación de *BRAF*, debida a la presencia de diferentes porcentajes de DNA genómico en la reacción, con respecto al número de ciclos. El total de DNA en la mezcla celular fue de 100 ng. En la tabla 7 se muestran los porcentajes de DNA genómico presente en cada reacción. La reacción de PCR se llevó a cabo durante 40 ciclos y se tomaron alícuotas a los 25, 30 y 35 ciclos de la reacción, para después observar el fragmento esperado de 125 pb en geles de agarosa al 2% como se muestra en la figura 6.

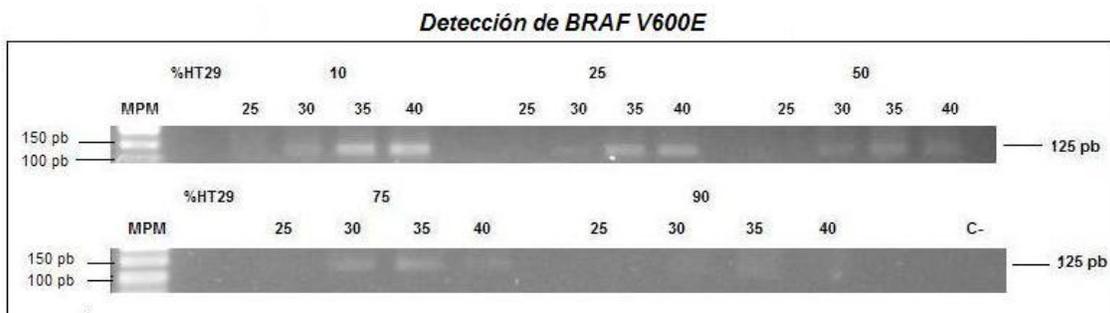
**Tabla 7.-** Porcentaje de DNA genómico de células HT29 y HeLa para la evaluación de la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E*

Reacción	% HT29	% HeLa
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	90	10

A)



B)



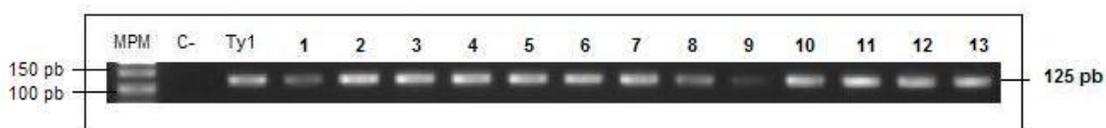
**Figura 6.-** Imagen de la electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los productos de amplificación para la evaluación de la presencia de *BRAF* a diferentes relaciones porcentuales de DNA genómico de células HeLa y HT29. A) Detección de la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y B) Detección de la presencia de *BRAFV600E*.

### iii. Evaluación de BRAF en muestras de cáncer de tiroides

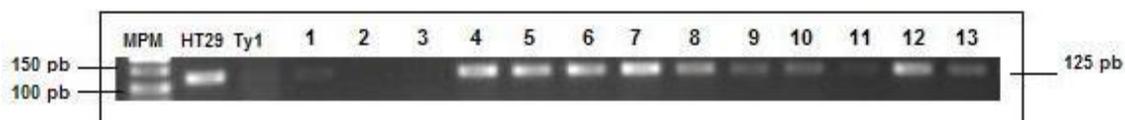
A partir de la estandarización de la PCR se establecieron las condiciones para la amplificación de *BRAF*<sup>+</sup> así como también de la amplificación del alelo mutado *BRAFV600E*, en el DNA genómico de cada una de las trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides. La amplificación se realizó durante 40 ciclos para *BRAF*<sup>+</sup> y 35 ciclos para *BRAFV600E*. Para observar los productos de PCR para la detección de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* se emplearon geles de agarosa al 2%. Se

utilizó como control positivo a la línea celular de adenocarcinoma colorectal (HT29) y también se utilizó un control negativo para asegurarse del correcto tratamiento de las muestras al llevar a cabo la PCR. (Figura 7).

A) Detección de *BRAF*<sup>+</sup>



B) Detección de *BRAFV600E*



**Figura 7.-** Detección de *BRAF*<sup>+</sup> y el *BRAFV600E* en muestras de cáncer de tiroides mediante la amplificación por MASA-PCR A) Detección de *BRAF*<sup>+</sup> en las trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides y, B) Detección de la mutación en *BRAFV600E* en pacientes con cáncer de tiroides. Para cada uno de los experimentos se utilizó como control positivo a las células HT29 y como control negativo se utilizó la mezcla de reacción. Las condiciones de PCR fueron 95°C, 10 min; 35x(95°C 30", 58°C 30", 72°C 30") ó 40 ciclos; 72°C 5 min. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa 2% y teñidos con bromuro de etidio.

A manera de resumen, a continuación se muestra una tabla con los resultados obtenidos de la detección de la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* en las trece muestras de pacientes con cáncer de tiroides. (Tabla 8).

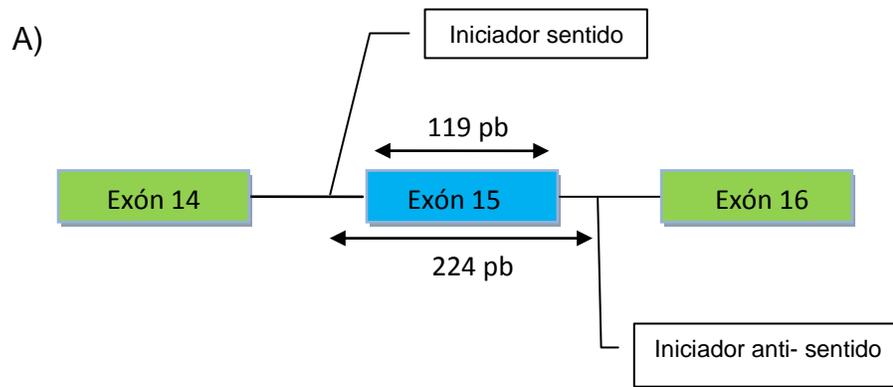
**Tabla 8.-** Resultados de la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* en muestras de tejido tiroideo, mediante el uso de la técnica MASA-PCR.

<b>Muestra</b>	<b><i>BRAF</i><sup>+</sup></b>	<b><i>BRAF V600E</i></b>
<b>1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>2</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>3</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>4</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>5</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>6</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>7</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>8</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>9</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>10</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>11</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>12</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>13</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>C+ HT29</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

**e) Secuenciación automatizada del exón 15 de BRAF**

La mutación en *BRAFV600E* se encuentra en el nucleótido 121 del exón 15 y una de las técnicas para evaluar la presencia de una mutación puntual es el empleo de la secuenciación automatizada, debido a esto, en el presente trabajo se empleó la secuenciación automatizada del exón 15 para la detección de la mutación en el gen *BRAF*. El exón 15 está flaqueado por los intrones 14 y 15, por lo que se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando un par de iniciadores específicos, ver Tabla 3. Los iniciadores, sentido y anti-sentido, para la amplificación del exón 15 reaccionan con el intrón 14 y con el intrón 15 respectivamente, teniendo como

producto esperado un fragmento de 224 pb. La representación esquemática y la secuencia de nucleótidos del exón 15 se muestran en la Figura 8.



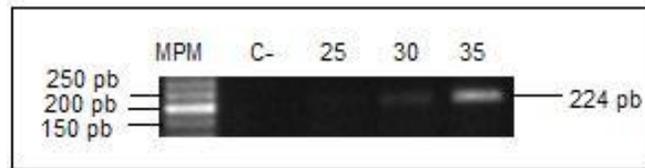
B)

```

ATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGATCTAC
TGTTCCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAG
TAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTC
CCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTGTGGATGGTAAGAATTGAG
GCTATTTTCCACTGATTAAATTTTGGCCCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGA
AAGTCATTGAAGGT
    
```

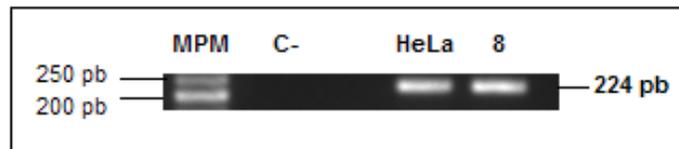
**Figura 8.-** A) Esquema de la localización del exón 15 así como el lugar en donde se alinean los iniciadores, además de la longitud del fragmento esperado B) Secuencia de nucleótidos del exón 15 en negritas y subrayado y la letra cursiva representa a los intrones 14 y 15 que flanquean al exón 15.

Se estandarizó la reacción de PCR, se realizó una curva de saturación en células HT29, la reacción se llevó a cabo durante 35 ciclos y se tomaron alícuotas a los 25 y 30 ciclos. El resultado de la amplificación fue observado en geles de agarosa al 2% (Figura 9)



**Figura 9.-** Imagen de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos de la estandarización de la PCR para la amplificación del exón 15 de *BRAF* en células HT29.

De acuerdo a lo obtenido en la estandarización, se realizó la amplificación del exón 15 durante 35 ciclos. A partir del DNA genómico de las trece muestras de pacientes, así como también de las células HeLa (Homocigota para *BRAF*<sup>+</sup>) y HT29 (Heterocigota para *BRAF*) y de la línea celular Ty1 se llevó a cabo la amplificación del exón 15. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y purificados con el *kit* QIAquick PCR purification (Figura 10) y finalmente enviados a secuenciar.



**Figura 10.-** Imagen representativa de la amplificación del exón 15 en cada una de las trece muestras y en las líneas celulares. En esta figura se muestra la amplificación del exón 15 en células HeLa y en la muestra 8 del paciente con cáncer de tiroides. Las condiciones de PCR fueron 95°C 10min, (95°C 30'', 58°C 30'', 72°C 30'')x 35 ciclos; 72°C 5 min.

A continuación, en la tabla 9, se muestra la secuencia del exón 15 de cada una de las trece muestras enviadas a secuenciar, así como también de las líneas celulares HeLa, HT29 y Ty1.

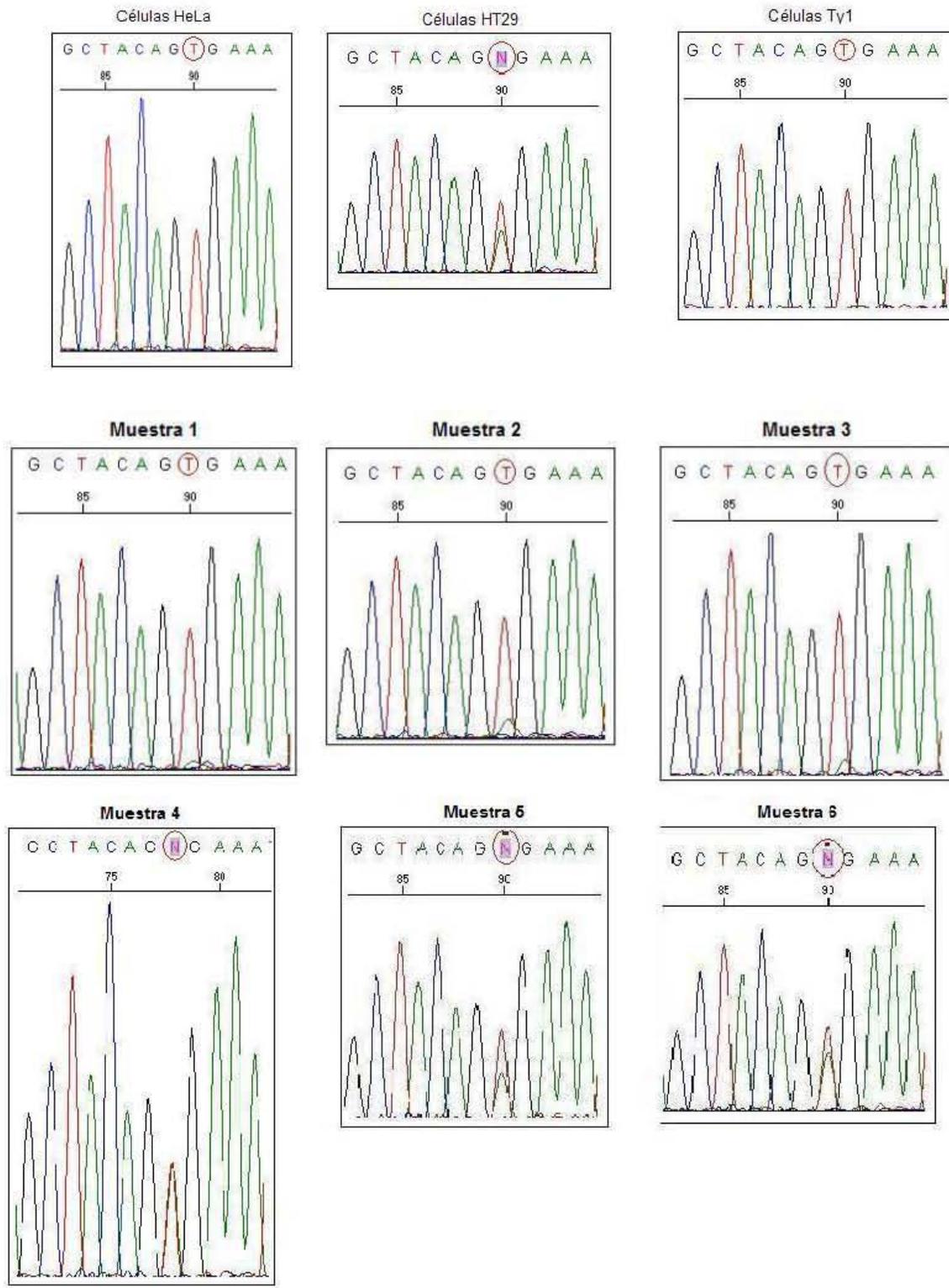
**Tabla 9.** Producto de la secuenciación del exón 15 en las 13 muestras de tejido tiroideo de pacientes con cáncer de tiroides. En esta secuencia se puede observar la mutación en estudio, que se encuentra en negritas. La presencia de la letra N indica la heterocigocidad de la muestra en estudio.

Muestra	SECUENCIA
<b>Células HeLa</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGC ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>Células HT29</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAG <b>NGAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAG TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGC ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>Células Ty1</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATNAAATTTTG
<b>1</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>2</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>3</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>4</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAG <b>NGAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>5</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAG <b>NGAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>6</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAG <b>NGAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG
<b>7</b>	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGT <b>GAAAT</b> CTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCACTGATTAATTTTG

Muestra	Secuencia
8	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGNGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCAAGTAAATTTTG
9	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGNGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCAAGTAAATTTTG
10	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATT
11	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCAAGTAAATTTTG
12	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGNGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCT ATTTTTCCAAGTAAATTTTG
13	ACCTCAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA TTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGT TGAACAGTTGTCTGGATCCA

Nota: Para la secuenciación de las muestras A y D se utilizó el primer anti-sentido del exón 15, por lo que en la tabla 10 se muestra la secuencia complementaria con fines de comparación entre resultados.

Para fines del análisis de resultados, en la figura 11 se muestran los electroferogramas obtenidos de la secuenciación del exón 15 de cada una de las muestras así como también del control positivo (HT29), del control negativo (HeLa) y células Ty1.



**Figura 11.** Resultados de la secuenciación del exón 15, en donde, a cada nucleótido le corresponde un color para diferenciarlos en el electroferograma, esto es, guanina (negro), citosina (Azul), adenina (Verde) y timina (Rojo). El nucleótido encerrado en un círculo indica la transversión T>A. Para las muestras A y D se utilizó el primer anti-sentido del exón 15

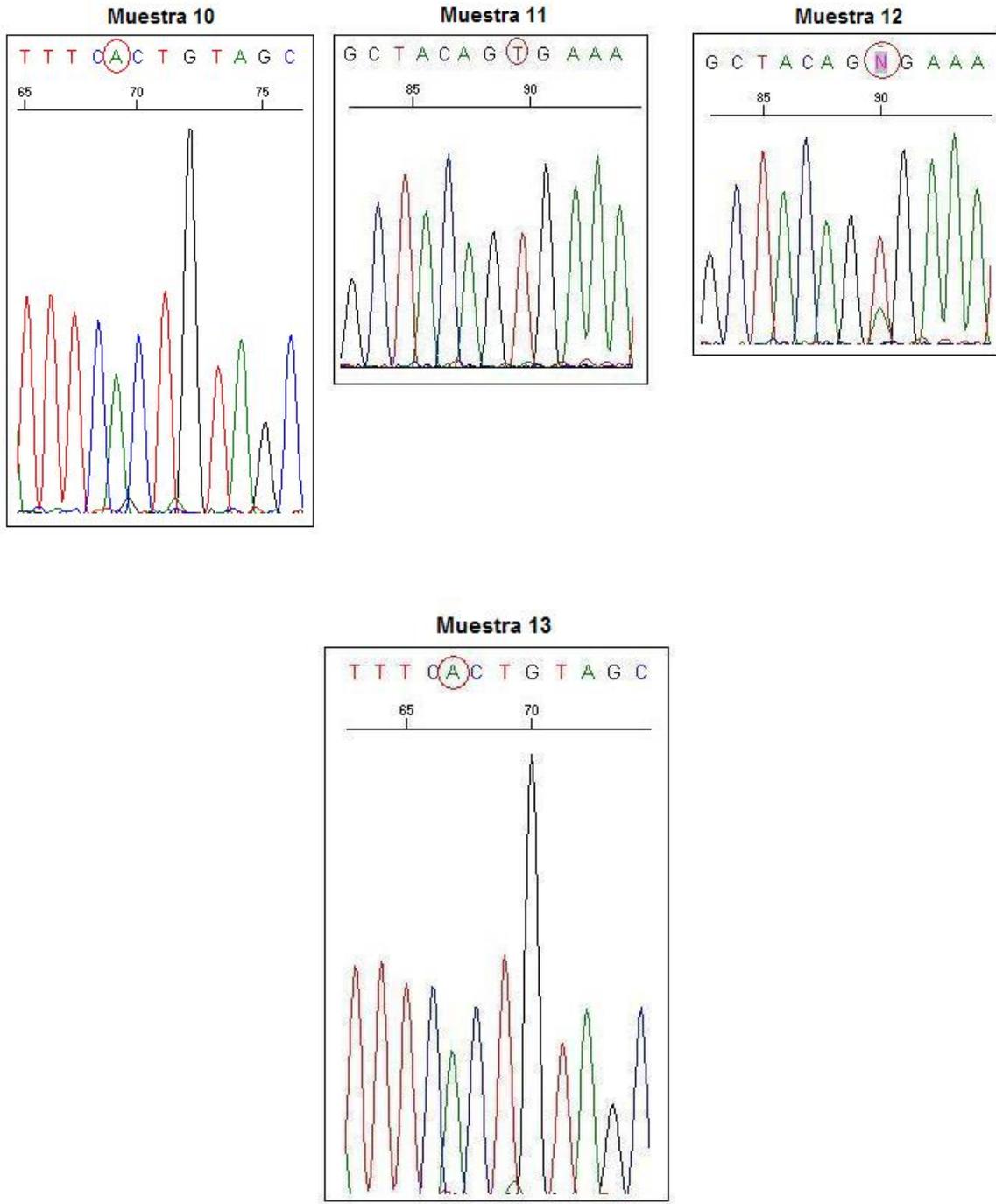


Figura 11.- Continuación

A continuación, en la tabla 10, se muestran de forma resumida los resultados obtenidos en la detección de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* empleando la técnica de MASA-PCR y la técnica de secuenciación automatizada.

**Tabla 10.-** Comparación de las metodologías empleadas para la detección de *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E*

Muestra	MASA – PCR		Secuenciación exón 15 T>A	Característica genética en base a MASA-PCR
	<i>BRAF</i> <sup>+</sup>	<i>BRAF</i> <i>V600E</i>		
HeLa	+	-	T/T	Homocigota wt
HT29	+	+	T/A	Heterocigota
Ty1	+	-	T/T	Homocigota wt
1	+	+	T/T	Heterocigota
2	+	-	T/T	Homocigota wt
3	+	-	T/T	Homocigota wt
4	+	+	T/A	Heterocigota
5	+	+	T/A	Heterocigota
6	+	+	T/A	Heterocigota
7	+	+	T/T	Heterocigota
8	+	+	T/A	Heterocigota
9	+	+	T/A	Heterocigota
10	+	+	T/T	Heterocigota
11	+	+	T/T	Heterocigota
12	+	+	T/A	Heterocigota
13	+	+	T/T	Heterocigota

## **VII.- DISCUSIÓN**

Para llevar a cabo la reacción de MASA-PCR, se extrajo el DNA genómico de cada una de las trece muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de tiroides. De acuerdo a la cantidad de DNA obtenido observamos que no hubo diferencia en presencia o ausencia de la mutación, ya que todas las reacciones de MASA-PCR se normalizaron a 100 ng de DNA de acuerdo a lo reportado por Sapio y cols. en el 2006 y por Henderson y cols. en el 2009. Esto lo podemos observar con la muestra 9 y la muestra 3, de las cuales se obtuvo la menor y mayor cantidad de DNA de todas las muestras, respectivamente. Así mismo observamos que, la cantidad de DNA no influyó en la detección de la mutación en *BRAFV600E*, ya que la muestra 3, de la cual se obtuvo la mayor cantidad de DNA, no se expresó el alelo mutado, sin embargo en la muestra 7 si se expresó la mutación en *BRAFV600E*. La elección de la zona del tejido a analizar fue variable, promoviendo la obtención de una población heterogénea es decir una mezcla de población celular normal y población celular tumoral.

Para la detección de la mutación en *BRAFV600E* se han empleado diferentes técnicas como RFLP, SSCP y secuenciación, Secuenciación directa, PCR-RT (Rodolico y cols., 2007)<sup>26</sup>, Nested-PCR (Henderson y cols., 2009)<sup>25</sup> y MASA-PCR (Xu y cols. 2003 y Sapio y cols., 2006, )<sup>4, 22</sup>. De acuerdo a lo reportado por Xu y cols., en el 2003 y por Sapio y cols., en el 2006, los autores utilizaron iniciadores específicos para la amplificación de un alelo mutado con dos y una sustitución en el extremo 3', respectivamente.<sup>22,4</sup> Sapio y cols. mencionan que la sustitución de dos bases puede reducir el alineamiento y la amplificación del alelo silvestre y reducir los falsos positivos, pero puede aumentar los falsos negativos, a diferencia de si usaban iniciadores con una sustitución. En base a esto, se decidió estandarizar la técnica de MASA-PCR, en muestras de pacientes mexicanos con cáncer de tiroides, utilizando la secuencia de los iniciadores previamente reportados con una sustitución en el extremo 3',<sup>4</sup>. De acuerdo a los resultados, se obtuvo que mediante el empleo de la técnica de MASA-PCR la mutación en *BRAFV600E* estuvo presente en 84.7% de los pacientes con PTC, si comparamos esto con la literatura, en el año 2003 Xu y cols., emplearon la técnica de MASA-

PCR, utilizando iniciadores con dos bases sustituidas, encontrándose así que la mutación *BRAFV600E* estaba presente en un 38% de los pacientes con PTC<sup>22</sup>. Así mismo, mediante el empleo de la técnica de MASA-PCR con iniciadores de una sola base sustituida encontraron que *BRAF* estaba mutado en un 44.2% de los pacientes con PTC<sup>4</sup>. Sin embargo en el 2009, Henderson y cols., detectaron la mutación por Nested-PCR, obteniendo así que la mutación en *BRAFV600E* estaba presente en 77.8% de pacientes con PTC.<sup>25</sup> Estas variaciones en la prevalencia de la mutación en pacientes con PTC, puede deberse a las técnicas empleadas para su detección, ya que la sensibilidad de cada una de las técnicas varía. De acuerdo a lo reportado por Sapio y cols., en el 2006, determinaron que la técnica de MASA-PCR fue más sensible para la detección de la mutación puntual en *BRAFV600E*.<sup>4</sup>

Para evaluar la sensibilidad de la técnica de MASA-PCR con respecto a las técnicas previamente descritas, Sapio y cols., evaluaron la presencia de la mutación *BRAFV600E* en una mezcla de dos líneas celulares (homocigota para *BRAF*<sup>+</sup> y homocigota para *BRAFV600E*) en diferentes proporciones. La evaluación de la mutación puntual en *BRAFV600E* la realizaron mediante diferentes técnicas, SSCP y su posterior validación mediante secuenciación automatizada, RFLP y MASA-PCR, en donde a partir del 60% de células mutadas observaron la presencia de la mutación con las técnicas de Secuenciación, SSCP y RFLP, sin embargo con la técnica de MASA-PCR a partir del 20% de células mutadas observaron la presencia de la mutación en *BRAFV600E*.<sup>4</sup> En este trabajo se realizó un experimento similar, empleándose una línea celular homocigota para *BRAF*<sup>+</sup> (HeLa) y una línea celular heterocigota para *BRAFV600E* (HT29), en el cual a partir del empleo de la técnica de MASA-PCR la detección de la mutación en *BRAFV600E* fue a partir del 10% de células mutadas.

Para comprobar la sensibilidad y corroborar los resultados obtenidos a partir del MASA-PCR, se empleó la secuenciación automatizada en base a lo reportado previamente<sup>4</sup>. Esto se realizó mediante la amplificación del exón 15 del gen *BRAF*, en donde obtuvimos que en un 53.8% de las muestras se detectó la mutación en *BRAFV600E* mediante la técnica de secuenciación a diferencia de lo obtenido

mediante la técnica de MASA-PCR (77.8%), debido a la variación en los resultados, se analizaron los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de cada una de las muestras.

En la muestra uno observamos que mediante el empleo de la técnica de MASA-PCR, se detectaron tanto el alelo silvestre como el alelo mutado, posteriormente se evaluó la mutación mediante la secuenciación automatizada, en donde a partir de la secuencia dada por el equipo sólo se detectó la presencia del alelo silvestre, es decir la presencia del nucleótido de timina, sin embargo al analizar el electroferograma dado por el secuenciador, observamos que dentro del pico correspondiente al nucleótido de timina se encuentra otro pico de menor intensidad, con un ligero desplazamiento hacia la derecha, correspondiente al nucleótido de adenina. Estas discrepancias con las diferentes técnicas puede deberse a la cantidad de células con el alelo mutado y a la cantidad de células con el alelo silvestre. Esto nos puede hablar de la heterogeneidad en la población celular analizada, ya que el secuenciador no detectó de manera significativa el alelo mutado, posiblemente la cantidad de células mutadas era mucho menor en comparación con la población de células normales.

En las muestras 2 y 3, mediante MASA-PCR se detectó la presencia de *BRAF*<sup>+</sup> y el alelo mutado, *BRAFV600E* no se detectó, estos resultados se confirmaron con la secuenciación automatizada, debido a que en la secuencia se observa la presencia del nucleótido de timina, correspondiente al alelo silvestre. Sin embargo, analizado el electroferograma, observamos que hay un pico con una intensidad muy baja correspondiente al nucleótido de adenina y con un ligero desplazamiento hacia la derecha, estos picos son de muy baja intensidad, esto puede deberse a la cantidad de células en la población celular tumoral y normal, ya que posiblemente la población celular tumoral era mínima con respecto a la normal, por lo cual la mutación no se detectó tanto por MASA-PCR como por la secuenciación automatizada.

En las muestras cuatro, cinco, seis, ocho, nueve y doce, observamos que mediante la técnica de MASA-PCR se detectaron tanto el alelo silvestre como el

alelo mutado, analizando el gel de agarosa, producto de la electroforesis, observamos que la intensidad de las bandas es variable, estos resultados fueron confirmados con la secuenciación, en donde vemos que todas las muestras son heterocigotas. Analizando los electroferogramas, la intensidad del pico correspondiente a la timina es de intensidad variable, así como también el pico que se encuentra sobrelapado que corresponde al de la adenina, es decir al cambio de nucleótido T1799A.

En la muestra siete, mediante la técnica de MASA-PCR, observamos que ambos alelos están presentes en la muestra y mediante la secuenciación observamos que el resultado es de una muestra homocigota para el alelo silvestre, esto de acuerdo a la secuencia dada. Sin embargo, analizando el electroferograma, observamos la presencia de un pico de menor intensidad sobrelapándose con el de timina, el cual corresponde al nucleótido de adenina. Analizando el gel de agarosa, producto de la electroforesis, observamos que las bandas son intensas, por lo que consideramos que la mutación debió de haber sido detectada a partir de la secuenciación.

En las muestras diez y trece, mediante la técnica de MASA-PCR, tanto el alelo silvestre como el alelo mutado fueron detectados, como podemos observar en los geles de agarosa las bandas correspondientes al alelo mutado fueron de menor intensidad a diferencia de lo ocurrido con las bandas obtenidas en la evaluación del alelo silvestre. Para la secuenciación de estas muestras se utilizó el iniciador anti-sentido del exón 15, por lo que la secuencia que nos arrojó el secuenciador es la complementaria, sin embargo analizando las secuencias y los electroferogramas, observamos que en ambas muestras no se detectó el cambio de base, como con la técnica de MASA-PCR. Esto confirma lo reportado por Sapio y cols., en donde mencionaron que cuando la cantidad de células tumorales analizadas es muy baja (<60%) con respecto a la cantidad de células normales en la muestra, el secuenciador no fue capaz de detectar la mutación en *BRAFV600E*.<sup>4</sup> Sin embargo de acuerdo a lo obtenido en la mezcla de líneas celulares, la mutación en *BRAFV600E* se detectó a partir de ~10% de células

mutadas mediante la técnica de MASA-PCR, por lo que probablemente la muestra contenía aproximadamente 10% de células mutadas.

En la muestra once, observamos que mediante la técnica de MASA-PCR, ambos alelos están presentes, sin embargo en la secuenciación, el resultado que se obtuvo fue el correspondiente a una muestra homocigota para el alelo silvestre, y eso se comprobó en el electroferograma ya que sólo se observó un pico correspondiente al nucleótido de timina. Al analizar el gel de agarosa de la electroforesis del producto de PCR, observamos que el gel que corresponde al análisis de la mutación en *BRAFV600E* (figura 7), la banda que corresponde a dicha muestra es de una intensidad muy baja, esto nos puede indicar que la población de células analizadas con la mutación fue muy poca y debido a esto, el secuenciador no fue capaz de detectar el alelo mutado.

Por otro lado, de acuerdo a lo reportado por Rodolico y cols., en el 2007, utilizaron un estuche comercial denominado B-RAF Mutector kit, el cual mediante el uso de la secuenciación pudieron detectar la mutaciones en *BRAFV600E*, *BRAFV600G* y *BRAFV600A*. Esta técnica puede ser mas sensible para la mutación pero la cantidad de las células mutadas presentes en una muestra heterogénea puede influir en la detección de la mutación.<sup>26</sup>

La presencia de la mutación en *BRAFV600E* en aproximadamente el 80% de las muestras del tejido tiroideo canceroso, que se encontraban en el estadio avanzado de la enfermedad, puede correlacionar con lo reportado previamente en la literatura. Esto corresponde a que en el año 2003, dos grupos de investigación independientes, Namba y cols. y Nikiforova y cols., reportaron que la mutación en *BRAFV600E* estaba asociado con los estadios avanzados, III y IV, del tumor<sup>27, 28</sup>, así mismo, en el mismo año, reportaron que había una asociación entre la mutación en *BRAFV600E* y el estadio metastásico<sup>22, 27, 29</sup>, sin embargo en el 2005, Puxeddu y cols., no encontraron asociación entre la presencia de *BRAFV600E* en el PTC y el estado del tumor, invasividad o metástasis a ganglios linfáticos.<sup>30</sup>

Mercer y cols. en el 2005, demostraron que la vía de señalización de ERK juega un papel importante en el desarrollo embrionario, esto lo demostraron mediante ratones knock-out de *Hras*, *Braf* y *Map2K1/2*, los cuales se vieron afectados en el desarrollo y se dirigieron a muerte durante la embriogénesis, debido a defectos en el hígado y presentar anemia, defectos vasculares y angiogénesis defectuosa en la placenta. Los ratones knock-out de *Braf* desarrollaron neoplasias hematológicas. Sin embargo la expresión directa de la mutación en *BrafV600E* en bazo, hígado, pulmón y corazón mostraron desordenes proliferativos e insuficiencia de la médula ósea con neoplasia linfoide y este ratón murió antes de las cuatro semanas de edad.<sup>31</sup>

En un estudio realizado en el 2009, Moses y cols., evaluaron por secuenciación directa mutaciones en *BRAF*, *RET/PTC3*, *NRAS*, *KRAS* y *RET/PTC1*, encontrando así que la mutación más común fue en *BRAFV600E*, la cual estuvo presente en un 66% de las muestras, sin embargo no encontraron diferencias significativas en el número o tipo de alteraciones genéticas presentes por género. Así mismo encontraron que había un mayor número de alteraciones genéticas en pacientes jóvenes, quienes fueron diagnosticados con PTC a una edad temprana. La presencia de un número mayor de alteraciones genéticas en pacientes jóvenes a diferencia de lo que pasa con pacientes mayores, sostiene la hipótesis de que los pacientes jóvenes son más susceptibles a transformaciones malignas debidas a la exposición ambiental. Los autores sugieren que las múltiples alteraciones genéticas en el cáncer de tiroides pueden estar asociadas con la progresión de la enfermedad y la presentación temprana.<sup>32</sup>

Finalmente Lee y cols., reportaron en el 2009 que los microcarcinomas papilares de tiroides, que son menores de 10 mm, presentaron la mutación en *BRAFV600E* en un 37.5% de las muestras, las cuales fueron analizadas por PCR. Así mismo encontraron que no había relación alguna entre la presencia de la mutación y características como género, edad y la presencia de bocio. Sin embargo, ellos reportaron que *BRAF* puede tener correlación con estadios avanzados de la enfermedad en los microcarcinomas papilares de tiroides.<sup>33</sup>

## **VIII.- CONCLUSIONES**

Se extrajo el DNA genómico de tres líneas celulares y trece muestras de pacientes mediante el empleo de un estuche comercial, el cual permitió obtener un mayor rendimiento en la extracción del DNA y una pureza mejor, a diferencia de lo obtenido en la extracción de DNA con el reactivo Trizol. Se estandarizó la reacción de MASA-PCR tanto para las líneas celulares como para las muestras de tejido, permitiendo así la evaluación de la presencia del alelo silvestre *BRAF*<sup>+</sup> y la presencia de la mutación puntual en *BRAFV600E*.

La mutación *BRAFV600E* mediante la técnica de MASA-PCR pudo ser detectada a partir de un porcentaje bajo de células que contenían la mutación, aproximadamente el 10%, como se pudo observar en el experimento de la mezcla de líneas celulares, en donde la detección de *BRAFV600E* fue a partir de los 30 ciclos de la PCR. En base a lo obtenido de la estandarización para la detección de *BRAF*, observamos que a partir de los 30 ciclos, *BRAF*<sup>+</sup> y *BRAFV600E* son detectables, por lo que su amplificación se realizó durante 40 y 35 ciclos, respectivamente.

De acuerdo a lo obtenido en este trabajo y en base a lo reportado previamente en el 2006, podemos decir que la técnica de MASA-PCR tiene una mayor sensibilidad para la detección de una mutación puntual como la mutación en *BRAFV600E*, a diferencia de la técnica de secuenciación automatizada, ya que la detección del alelo mutado por MASA-PCR fue del 84.6% y por la secuenciación fue del 53.8% de un total de 13 muestras.

Es importante la detección temprana de esta mutación en el PTC ya que esta variante se ha visto que es una lesión antecesora del carcinoma anaplásico tiroideo, el cual es un tumor no diferenciado, agresivo que metastatiza tempranamente y su pronóstico es muy precario.<sup>21</sup>

La cascada de señalización de ERK regula múltiples procesos requeridos para la proliferación y supervivencia de las células normales. La hiperactivación de la vía resulta en la desregulación de la proliferación celular y la transformación maligna en sistemas modelo y ocurre comúnmente en tumores humanos, en los cuales la activación de ERK ocurre como resultado de la activación del receptor tirosina cinasa o por la mutación en miembros de los genes *RAS* y *RAF*, en este caso la mutación en la isoforma B del gen *RAF*.<sup>13</sup>

En base a lo reportado por Kebebew y cols., en el 2007, encontraron que los estudios *in vitro* y los modelos transgénicos sugieren que la mutación en *BRAF* promueve la progresión del cáncer tiroideo y lo han asociado fenotípicamente a la invasividad del cáncer de tiroides.<sup>23</sup>

Aún no se conoce el mecanismo molecular responsable de la alta frecuencia de la mutación de *BRAFV600E* en el PTC, pero es posible que esta mutación se deba, en parte, como resultado de una reparación del DNA por corrección defectuosa de las bases mal apareadas.<sup>22</sup> Por último, debido a que el diagnóstico del cáncer de tiroides se realiza cuando el tumor ya está presente, ya sea por yodo radioactivo o biopsias con aguja fina, es importante desarrollar metodologías capaces de detectar algún bio-marcador que identifique a esta neoplasia, una de estas técnicas de diagnóstico es el análisis de mutaciones específicas de un alelo, en este caso la mutación V600E, la cual se ha reportado que es característica de PTC, por lo que la técnica de MASA-PCR es una herramienta de gran utilidad y accesible para la detección de la mutación a diferencia de la secuenciación, que es una técnica con un costo mayor que la PCR. Por estas razones la implementación de esta técnica sería importante para ayudar al diagnóstico temprano de la enfermedad.

## **IX. - BIBLIOGRAFÍA**

1. Hanahan D and Weinberg R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
2. Dhillon AS, Hagan S, Rath O and Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-3290.
3. Santarpia L, Sherman S I, Marabotti A, Clayman G L and El-Naggar A K, (2009). Detection and molecular characterization of a novel B-RAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Human Pathology* 40(6):827-833.
4. Sapio M. R., Posca D., Troncone G., Pettinato G., Palombini L., Rossi G., Fenzi G and Vitale M. (2006) Detection of B-RAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *European Journal of Endocrinology* 154:341-348.
5. Cammeselle Teijeiro José y Sobrinho-Simoes Manuel (2003). Carcinoma papilar de la glándula tiroides, Problemas en el diagnóstico y controversias. *Rev. Esp. Patol* 36(4): 373-382
6. Al-Brahim N. and Asa S.L. (2006). Papillary Thyroid Carcinoma. An Overview. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1057-1062 Frasca F, et al. (2008). B-RAF<sup>(V600E)</sup> mutation and the biology of Papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 15: 191-205
7. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzon E, Belfiore A and Vigneri R. (2008). BRAF<sup>(V600E)</sup> mutation and the biology of Papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 15:191-205
8. Pimienta Genaro, Jaime Pascual (2007). Canonical and Alternative MAPK Signaling. *Cell Cycle* 6(21):2628-2632.

9. Cara L B and Honnavara N A (2008). Oncogenic potential of B-RAF versus RAS. *Cancer letters* 261:137-146
10. Maosong Qi and Elaine A. Elion (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* 118:3569-3572.
11. Montagut C, Settleman J. (2009). Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer letters* 283:125-134
12. Pratilas C A, Taylor B S, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit D B and Rosen N (2009). <sup>V600E</sup>BRAF is associated with disable feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11):4519-4524
13. Leicht D. T., et. al. (2007). Raf Kinases: Function, Regulation and Role in Human Cancer. *Biochim. Biophys Acta* 1773(8):1196-1212.
14. Weber C. K., Slupsky J. R., Kalmes H. A and Rapp U. R. (2000) Active Ras Induces Heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Research* 61:3595-3598.
15. Dhillon A. S. and Kolch W. (2004) Oncogenic B-Raf mutations: Crystal clear at last. *Cancer cell*:303-304
16. Nikiforov YE, 2008. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol.Suppl* 2:S37-43.
17. Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teangue J, Woffendin H, Garnett M, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, et. al. (2002). Mutations of the *BRAF* gen in human cancer. *Nature* 417:949-954
18. Knauf J A and Fagin J A (2009). Role of MAPK pathway oncoproteins in Thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 296-303

19. Wan P, Garnett M, Roe S, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good V, Cancer Genome Project, Jones C, Marshall C, Springer C, Barford, Marais R. (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-867.
20. Halilovic E. and Solit D. B. (2008). Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Current Opinion in Pharmacology*. 8:419-426.
21. Quiros R.M., Ding H.G., Gatusso P, Prinz R.A. and Xu X. (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *American Cancer Society* 103(11): 2261-2268.
22. Xu X., Quiros R. M., Gattuso P., Ain K. B and Prinz R. a. (2003). High Prevalence of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Thyroid Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 63, 4561-4567.
23. Kebebew E, Weng J., Bauer J., Ranvier G., Clark O. H., Duh Q., Shibru D, Bastian B and Griffin A. (2007). The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Annals of Surgery*. 246:466-471.
24. Fukushima T., Suzuki S., Mashiko M., Ohtake T., Endo Y., Takebayashi Y., Sekikawa K., Hagiwara K. and Takenoshita S. (2003). BRAF mutations in Papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 22, 6455-6457.
25. Henderson Y, Shellenberger T, Williams M, El-Naggar A, Frederick M, Cieply K and Clayman G. (2009). High Rate of BRAF and RET/PTC Dual Mutations Associated with Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res* 15(2):485-491
26. Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, Richiusa P, Gebbia N, Martorana A, Russo A, Amato M, Galluzzo and Giordano C. (2007).  $BRAF^{V600E}$  Mutation and p27kip1 Expression in Papillary Carcinomas of the Thyroid  $\leq 1$  cm and Their Paired Lymph Node Metastases. *Cancer* 15(110):1218-1226

27. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S and Rogounovitch TI. (2003). Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4393-4397
28. Nikiforova M, Kimura E, Gandhi M, Biddinger P, Knauf J and Basolo F. (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5399-5404
29. Kim K, Kang D, Kim S, Seong I and Kang D. (2004). Mutations of the BRAF gene in Papillary Thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J.* 45:818-821
30. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R and Martinelli M. (2004). BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic Papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2414-2420
31. Mercer K, Giblett S, Green S, Lloyd D, DaRocha D, Plumb M, Marais R and Pritchard C. (2005). Expression of endogenous oncogenic V600E B-Raf induces proliferation and development defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer Res* 65:11493-11500
32. Moses W, Weng J, Khanafshar E, Duh Q, Clark O and Kebebew E. (2009). Multiple Genetic Alterations in Papillary Thyroid Cancer are Associated with Younger Age at Presentation. *Journal of Surgical Research* Article in press:1-5
33. Lee, Gao M, Ji Y, Yu Y, Feng Y, Li Y, Zhang Y, Cheng W and Zhao W. (2009). Analysis of Differential BRAFV600E Mutational Status in High Aggressive Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 16:240-245.

## X.- APÉNDICE

### DEFINICIONES

#### Alelo

Una de las formas diferentes de un gen que existe en un *locus*

#### Heterocigoto

Se refiere a los alelos diferentes para una característica

#### Homocigoto:

Se refiere a los dos alelos iguales para una o más características

#### Incidencia

Es el número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado

#### Inversión paracéntrica

Es el resultado de dos rupturas en un cromosoma, seguida de la re inserción del fragmento, sin incluir al centrómero, en su sitio original pero en orientación opuesta.

#### Locus

Se refiere a la posición fija en un cromosoma

#### Mitógeno

Substancias extracelulares que estimulan la proliferación celular.

#### Oncogén:

Gen que codifica una proteína capaz de transformar las células normales en células cancerosas o de inducir cáncer en animales. De los muchos oncogenes conocidos, todos, salvo escasas excepciones, derivan de genes celulares normales (genes denominados proto-oncogenes), cuyos productos participan en las vías de control del crecimiento celular

#### Prevalencia

Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una enfermedad determinada en un momento o en un periodo de tiempo determinado

#### Senescencia

Sinónimo de envejecimiento, las células dejan de dividirse y entran a la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular de manera permanente y permanecen metabólicamente alteradas

#### Transversión

Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro, es decir de una purina a pirimidina o viceversa

## **i.- ABREVIACIONES**

Antisen: anti-sentido

DMEM: Dubelco's Modified Eagle Medium

dNTP: desoxinucleótidostrifosfatados

EDTA: acido etilendiaminotetraacético

g: gramo

M: Molar

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Proteína cinasa activada por mitógenos)

MASA-PCR: Mutation allele specific amplification-reacción en cadena de la polimerasa (amplificación específica del alelo mutado por PCR)

mg: miligramo

mL: mililitro

mM: milimolar

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PTC: Papillary Thyroid Carcinoma (carcinoma papilar de tiroides)

RET: proto-oncogén Ret u oncogén RET

Sen: sentido

SFB: Suero fetal bovino

Wt: "wild type" o silvestre

μl: microlitro

## ANEXO

### *Reactivos*

#### **Acido acético glacial**

Frasco 25 mL, 99.8%, 695084, Sigma

#### **Ácido etilendiaminotetraacético**

Frasco 500g, grado biología molecular, H5032, Promega.

#### **Agarosa.**

Frasco 500 g, 15510-027, INVITROGEN

#### **Agua.**

MilliQ, Millipore

#### **Bromuro de etidio.**

Frasco, A11520100, APPLICHEM.

#### **Cloroformo.**

Frasco 25 mL, C-2432, Sigma.

#### **Desoxi Nucleótidos Tri-fosfatados (dNTP's)**

Vial 200  $\mu$ L, 10 mM Mix, Invitrogen.

#### **Dimetil-sulfóxido**

Frasco 50 mL. grado cultivo celular, A3672,00500, Applichem.

Research Organic. D5879

#### **DMEM.**

Frasco, 12648010

**Etanol**

Frasco 500 mL, absoluto E7023, Sigma.

Frasco 500 mL, grado biología molecular. E7148, Sigma.

**Hidróxido de sodio**

Frasco 1Kg, S-8045, Sigma Ultra.

**Isopropanol**

Grado biología molecular. 500 mL. I-9516, Sigma

**Marcador de peso molecular:**

DNA ladder 50 pb, N3236 L, New England Biolabs

Proteinasa K

Vial, 20 mg/mL, P8102S New Englands Biolabs.

**Suero fetal bovino:**

Botella, 16000-044, GIBCO

**Taq polimerasa:**

AMPLITAQ GOLD twelve paq 10X PCR BUFFER. N808-0240, Applied biosystems

**Tripsina.**

Frasco 100 mL, 0.25%, SM2001C

**Trizma Base.**

Frasco de 500 g, T6791, Sigma.

**Trizol reagent.**

Frasco 200 mL. 15596018, Invitrogen.

### **Estuche comercial para extracción de DNA**

QIAamp® DNA mini Kit(250). Q01-51306, QIAGEN

### **Estuche comercial para purificación de DNA**

QIAquick PCR Purification Kit (250) 28106, QIAGEN

*Equipo empleado*

### **Balanza analítica**

Classic, Mettler Toledo

### **Cámara para geles de agarosa**

HMP2018, Cleaver Scientific Ltd

### **Centrífuga**

Allegra™ 25R, Beckman Coulter™

### **Fuente de poder**

Power Pac- Basic, 16450501383, BIO-RAD

### **Mini-centrífuga:**

Pico, Sorvall®

### **Espectrofotómetro**

NanoDrop ND 1000. Spectrophometer, NanoDrop Technologies

### **Secuenciador**

96 capilares, modelo 3730xl, Applied Biosystems.

### **Termociclador**

Gene Amp® PCR System 9700. Applied Biosystems

### **Termo mezclador**

Thermomixer comfort eppendorf

*Preparación de soluciones para extracción de ácidos nucleicos con Trizol®.*

### **Citrato de sodio 0.1 M (MM 294,01) en 10% de etanol**

Para preparar citrato de sodio 0.1M se pesaron 1.4705 g de citrato de sodio dihidratado y se disolvió en 50 mL de agua. Se envió a esterilizar y se agregaron 5 mL de etanol para tener una concentración de citrato de sodio 0.1M en 10% de etanol absoluto. Los cálculos se muestran a continuación:

$$0.1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ citrato de sodio} * \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * 50 \text{ mL agua} * 294.10 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ citrato de sodio} \\ = 1.4705 \text{ g citrato de sodio}$$

### **Hidróxido de sodio: NaOH 8mM (MM 40,01)**

A partir de una solución de NaOH 1 M, se prepararon 10 mL de NaOH 8mM, tomando 80µL de NaOH 1M y se llevó a 10 mL

Para preparar la solución NaOH 1 M se pesaron 0.748 g NaOH y se disolvieron en 20 mL de agua destilada. Los cálculos se muestran a continuación:

$$1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * \frac{40\text{g}}{1\text{mol}} * \frac{98\text{g}}{100\text{g}} * \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * 20\text{mL} = 0.748 \text{ g NaOH}$$

Para preparar la solución NaOH 8mM se empleó la siguiente ecuación:

En donde

$C_i$  = concentración inicial de NaOH (1M)

$V_i$  = Volumen que hay que tomar para preparar una solución de NaOH

$C_f$  = concentración deseada de NaOH (8mM)

$V_f$  = volumen deseado de solución (10 mL),

Entonces la ecuación es la siguiente:

$$V_f = 0.008M * \frac{10mL}{1M} = 0.08 mL * \frac{1000\mu L}{1mL} = 80\mu L \text{ de NaOH } 1M$$

### **Preparación de solución reguladora para electroforesis en geles de agarosa**

TAE 1X

Para preparar TAE 1X, se partió de una solución de TAE 50X que se preparó utilizando los siguientes reactivos: Trizma base, ácido acético glacial y 0.5M EDTA a pH 8.0.

Para preparar dicha solución se pesaron 121 g de trizma base y se disolvieron en 250 mL agua doblemente destilada, se agregó 28.5 mL de ácido acético glacial y 50 mL de EDTA 0.5 M a pH8.0, ya disuelto se llevó a 500 mL.

Para una solución de TAE 1X se tomaron 2 mL de TAE 50X por cada 100 mL de TAE 1X que se preparó.

### **Preparación de gel de agarosa al 2%**

Se pesaron 2 g de agarosa y se disolvieron en 100 mL de TAE 1X, se agregaron 7 $\mu$ L de bromuro de etidio por cada 100mL de TAE 1X