



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE POSGRADO

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DE DOS
ISOFORMAS DEL GEN *CTNNB1* (BETA CATENINA) EN
TUMOR DE WILMS EN NIÑOS MEXICANOS**

T E S I S

Que para obtener el posgrado de:

ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P r e s e n t a

IBQ José Fernando Castillo Peñaloza

Tutora:

Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Asesora:

Dra. Carolina Barrientos Salcedo

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.



REF: FQUI/DIR/121/2010

LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA

Coordinador de la Unidad de Administración del Posgrado.

Presente.

Me es grato informarle que el alumno **JOSE FERNANDO CASTILLO PEÑALOZA** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341) con la tesina "**ESTUDIO MOLECULAR DE LA EXPRESION DE DOS ISOFORMAS DEL GEN CTNNB1 (BETA-CATENINA) EN TUMOR DE WILMS EN NIÑOS MEXICANOS**", ante el siguiente jurado,:

Presidente: Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez (CMNSXXI)

Vocal: Dr. Diego Julio Arenas Aranda (CMNSXXI)

Secretario: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios (FQ UNAM)

Primer Suplente: Dr. Armando Isibasi Araujo (CMNSXXI)

Segundo Suplente: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa (CMNSXXI)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., 18 de febrero de 2010.

El Director

Dr. Eduardo Bárzana García

TR

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510
Tels: (525) 616-2604 y (525) 622-3690
Fax: (525) 616-1858
e mail direc@servidor.unam.mx

Dedicatoria:

A mi esposa Nora por todo su apoyo, comprensión y confianza.

A mis Hijos Fernando, Nora y Carlos con todo mi amor y por permitirme sacar esa energía que no me deja vencerme.

A mi Madre Celia por su apoyo incondicional brindado en mi vida y en mi profesión.

A mi tía Rosenda sin su especial dedicación no lo hubiera logrado.

A mis Suegros y a mi cuñado Cuauhtémoc por brindarme su apoyo cuando fue necesario.

Agradecimientos

A la Unidad de Investigación en Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS por la oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Fondo para el fomento a la investigación (FOFOI) por el apoyo recibido con el número 2005-1-I-011 a RP.

A los profesores de la Especialización en Bioquímica Clínica de la Facultad de Química, por sus excelentes cátedras.

A la Dra. Carolina Barrientos por su enseñanza.

A la grande y maravillosa UNAM.

A los médicos, pacientes y padres que participaron en el estudio.

INDICE GENERAL

• Contenido:	Página
• I. Índice de Figuras	7
• II. Índice de Tablas	7
• III. Abreviaturas	8
• IV. Resumen	9
• V. Generalidades	
○ 5.1 Introducción	10
○ 5.2 Organización del gen beta catenina.	11
○ 5.3 Funciones de la proteína beta catenina.	12
○ 5.4 Contacto célula - célula mediante señalización.	13
○ 5.5 Modelo del arreglo molecular en la adhesión mediada por el complejo cadherina-catenina.	15
○ 5.6 Mutaciones de beta catenina en diversos cánceres.	19
○ 5.7 Vía de señalización Wnt y betacatenina.	22
• VI. .Justificación	25
• VII. Objetivos	25
• VIII. Hipótesis	25
• IX. Material y Métodos	26
○ 9.1.Muestras	26
○ 9.2 Descripción de tumores	27
○ 9.3 Metodología. Extracción de RNA	29
○ 9.4 Transcripción acoplada a Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Síntesis de cDNA	30
○ 9.5 Selección de primers	31
○ 9.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
○ 9.7 Purificación de amplificadores	33
○ 9.8 Reacción de secuenciación	34
• X. Resultados	
○ 10.1 Obtención y cuantificación de RNA	35
○ 10.2 Resultado de las condiciones para PCR	36
○ 10.3 Amplificación de las isoformas del gen	

beta catenina expresados en las muestras	38
○ 10.4 Análisis de la expresión de las isoformas 613 pb y 454 pb de beta catenina por QPCR	39
○ 10.5 Secuenciación de la banda de 454pb.	40
● XI. Discusión	42
● XII. Conclusión	45
● XIII. Referencias	46
● XIV. Anexos	51

I. Índice de Figuras	Pág.
1. Representación esquemática del contacto célula-célula mediado por cadherinas y alfa y beta cateninas	14
2. Adhesión mediada por el complejo cadherina-catenina	15
3. Representación tridimensional de los ectodominios de E-cadherina	16
4. Representación esquemática de la interacción de beta catenina en citoplasma y núcleo	17
5. . Vía de Señalización WNT	22
6. Representación esquemática de las mutaciones de beta catenina en el tumor de Wilms.	23
7. Electroferograma de RNAs de muestras de TW	35
8. Electroferograma de RT-PCR de muestras de TW	37
9. Electroforesis de los productos de PCR	38
10. Curvas de amplificación del QRT-PCR en tiempo real.	
A) El primer cuadro indica la amplificación del fragmento de 613 pb y el segundo cuadro el de 454 pb.	39
B) curvas de incorporación de fluorescencia que indican la concentración de los fragmentos amplificados	40
11. Secuencia silvestre sentido que muestra el sitio aceptor de corte y empalme (splicing).	41

II. Índice de Tablas

1. Mutaciones en gen beta-catenina en tipos de cáncer	20
2. Tabla de Resultados. Obtención de RNA	36

III. Abreviaturas

Gen	<i>CTNNB1 o gen beta catenina</i>
TW	tumor de Wilms
cDNA	DNA complementario
QRT-PCR	RNA convertido a cDNA por transcriptasa reversa seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
WAGR	(tumor de Wilms, aniridia, alteraciones genitourinarias y retardo mental),
BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
DDS	Síndrome de Denis-Drash,
Genes en TW:	<i>WT1, IGF2 (WT2); WT3; FWT1 y CTNNB1</i>
Ntd	<i>nucleótidos</i>
pb	<i>pares de bases</i>

IV. RESUMEN

El tumor de Wilms o nefroblastoma es el tumor renal infantil más frecuente a nivel internacional. Los mecanismos moleculares que inician esta neoplasia y que involucran al gen beta catenina aun no han sido esclarecidos totalmente. Existe información de que el RNA mensajero de beta catenina se encuentra alterado pero no se ha estudiado la expresión de las isoformas en el tumor de Wilms. El presente trabajo se analizó la variación de la expresión del gen beta catenina, particularmente en el exón 16 en tumores de Wilms y se comparó el resultado con una muestra de tejido normal. Se extrajo RNA por el método convencional y se convirtió a cDNA con transcriptasa reversa seguida de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QRT- PCR). Los resultados obtenidos demostraron la expresión diferencial de las isoformas +/- 159 del gen beta catenina en tumores de Wilms con respecto a tejido renal sano. La isoforma +159 pb (613 pb) del gen beta catenina se expresó en los tumores en proporción 1 a 4 con respecto a la isoforma -159 pb (454 pb). Esta relación sugiere que la isoforma +159 pb del gen beta catenina juega un papel importante en el desarrollo del tumor de Wilms confiriéndole un fenotipo neoplásico.

Palabras clave: Tumor de Wilms, nefroblastoma, gen beta catenina, isoformas +/- 159pb, cáncer.

V. GENERALIDADES

5.1 INTRODUCCIÓN

El tumor de Wilms (TW) o nefroblastoma es una neoplasia renal embrionaria que ocupa el sexto lugar de las neoplasias renales malignas infantiles en el Distrito federal (1). En Estados Unidos tiene una incidencia de uno en 10,000 recién nacidos vivos (2). Se ha profundizado en el estudio molecular de los tumores de Wilms porque representan un buen modelo para las neoplasias renales infantiles y porque recapitula el desarrollo del riñón. El tumor puede presentarse de manera unilateral o bilateral, por sus características celulares es heterogéneo y puede estar constituido por tres tipos histológicos: estromal, epitelial y blastemal (3).

El TW esta asociado a diferentes síndromes como WAGR (tumor de Wilms, aniridia, alteraciones genitourinarias y retardo mental), BWS (Beckwith-Wiedemann), DDS (Denis-Drash), Perlman y Frasier entre otros (4-7).

Se ha informado de varios genes involucrados en el desarrollo del tumor como son *WT1* e *IGF2* (*WT2*) que se localizan en la región cromosómica 11p13 y 11p15 respectivamente; el gen *WT3* aún no identificado pero mediante estudios de pérdida de heterocigocidad se sabe que debe estar localizado en el brazo largo del cromosoma 16, un cuarto gen llamado *FWT1* localizado en 17q12-21 que es el gen de predisposición familiar al tumor y el quinto es el que motiva este estudio es el gen *CTNNB1* mejor conocido como Betacatenina, beta catenina o β -catenina, ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21.3-22) (8,9).

Los genes *beta catenina*, *IGF2* y *WT1* regulan la proliferación celular y se sobre-expresan en tumores que se asocian a diversos síndromes genéticos, pero aun se desconoce si actúan por separado o en interrelación molecular por algún mecanismo molecular común (10).

5.2 ORGANIZACIÓN DEL GEN BETA CATENINA.

La estructura primaria del gen *CTNNB1* (beta catenina) humano fue determinada por análisis de cDNA y clonas genómicas (8). El tamaño del gen es de 23.2 kb distribuidos en 16 exones. Todos los sitios donadores y aceptores de corte y empalme ("splicing") siguen la regla GT/AG. Los límites de tamaño de los exones van de 61 a 790 pb. La mitad de los intrones son menores a 550 pb, siendo el más pequeño de 84 pb y el más largo de 6700 pb. Las uniones intrón-exón coinciden con los sitios conservados de las 12 secuencias repetidas *armadillo* o con la unión intrón-exón en el gen *armadillo* de *Drosophila*. El principal sitio para el inicio de la transcripción fue identificado en la región A compuesta por 214 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio ATG. El resultado del transcrito es una proteína de 3362 pb. La región 5' es altamente rica en GC y carece de cajas CCAAT pero contiene caja TATA y sitios potenciales de unión para diferentes factores de transcripción como NFkB, SP1, AP2 y EGR1. Además, el corte y empalme alternativo es un mecanismo de regulación de los factores de transcripción; por el que se puede modificar la afinidad y la especificidad de unión al DNA, la activación, la represión y la dimerización de proteínas; lo que puede ser específico de diferentes etapas del desarrollo embrionario y tumoral (9).

En el transcrito de beta catenina se encuentra un sitio aceptor de corte y empalme dentro del exón 16 que comprende la inserción o no de 159 pb. La amplificación de cDNA por PCR en 14 líneas celulares humanas demostró la expresión de ambas variantes de corte y empalme. Este gen puede presentar al menos dos isoformas como resultado de corte y empalme alternativo (8).

5.3 FUNCIONES DE LA PROTEINA BETA CATENINA.

Las proteínas sustentan muchas de las funciones celulares: Por un lado, forman parte de la cascada de transducción de señales que comienza con la activación de un receptor, por otra, son responsables de la relación de la célula con su medio o de la célula con otra célula vecina y finalmente, dan forma a la célula constituyendo el citoesqueleto, etc.

La proteína beta catenina interviene en dos procesos totalmente distintos:

1. Es una proteína estructural que forma parte de las uniones adherentes entre células epiteliales vecinas, que son críticas para el establecimiento y el mantenimiento de las capas epiteliales. La beta catenina se une a la alfa y gama-catenina, que a su vez se unen al citoesqueleto de actina de la célula y, además, conecta con cadherinas trans-membranarias que se relacionan con cadherinas de células vecinas, constituyendo así un fuerte ensamblaje que conecta las células entre sí (11).

2. La beta catenina puede actuar fuera del complejo de los contactos focales activando factores de transcripción y provocando la activación de genes. Regula el crecimiento y desarrollo normales de la célula en varios estadios de embriogénesis, participa en la cicatrización de heridas y en la metástasis tumoral. Es un componente de la ruta de señalización de Wnt, que está involucrada en la diferenciación renal; se ha aislado en aproximadamente el 15% de los tejidos tumorales y en cáncer como el de ovario, de hígado, de colon, de próstata y de pulmón entre otros (12-20).

5.4 CONTACTO CÉLULA-CÉLULA MEDIANTE SEÑALIZACIÓN.

La interacción célula-célula incluye una adhesión con proteína extracelular llamadas cadherinas (proteínas de adhesión dependiente de calcio) y efectores intracelulares que son las cateninas (11). Estas últimas tienen un papel importante en el desarrollo del embrión además de ser factores de transcripción. Beta catenina es similar a su homólogo *armadillo* y ambos actúan en la vía de señalización Wnt (21,22).

Como se mencionó anteriormente, la beta catenina forma complejos con las cadherinas que son glicoproteínas con un peso molecular entre los 115 y los 140 kDa, capaces de mediar la adhesión célula-célula en una manera dependiente de calcio. Las cadherinas expresadas en la superficie de células adyacentes se unen entre sí (unión homo típica), para mantener las células juntas y conservar la arquitectura tisular, además, participan en el desarrollo de órganos y vasos, y en la cicatrización de heridas. La eliminación del dominio citoplásmico de cadherina bloquea la agregación celular lo que demuestra su papel de regulación interna. Las primeras cadherinas que se identificaron tienen una expresión tejido-específica y fueron nombradas de acuerdo al tipo de células que las expresan: la E-cadherina se encuentra en células epiteliales, la N-cadherina en tejido neural y la P-cadherina en placenta. Dadas las diferentes funciones de las cadherinas, representan una larga lista de posibles blancos terapéuticos; por ejemplo, se sabe que el patrón de expresión de cadherinas en neoplasias agresivas presenta diferencias con el patrón en neoplasias poco agresivas (23,24).

Un estudio con muestras de carcinomas encontró que los niveles de expresión de beta catenina correlacionan con los de E-cadherina. La baja expresión de beta catenina se asocia a la presencia de metástasis nodales y a un pronóstico desfavorable.

Utilizando modelos murinos, se ha demostrado que las células tumorales con baja expresión de E-cadherina y beta catenina incrementan su capacidad de penetrar a la circulación vascular y de generar metástasis (25-28).

Las cadherinas mediante una señal de reconocimiento se unen a otra cadherina en el ligando extracelular. La región extracelular de cadherinas contiene cinco dominios consecutivos de hojas beta. Las moléculas de cadherina forman dímeros cis a través de la interacción de los dominios de las hojas beta. (Fig. 1). Un estudio estructural previo de fragmentos de cadherina sugiere que la unión trans envuelve al dominio N-terminal. La región citoplasmática (extremo carboxilo terminal) de las cadherinas está conectada al citoesqueleto de actina mediante proteínas de la familia de las Cateninas (26).

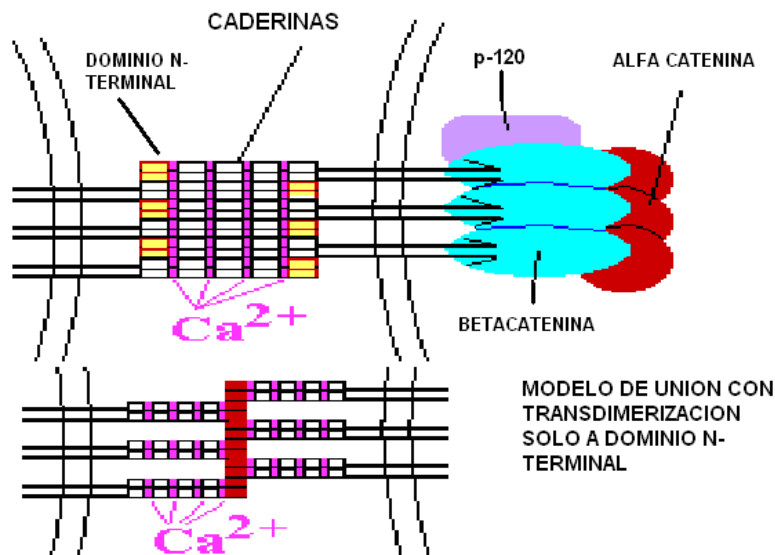


Figura 1. Representación esquemática del contacto célula-célula mediado por cadherinas y cateninas (alfa y beta) (28)

5.5 MODELO DEL ARREGLO MOLECULAR EN LA ADHESIÓN MEDIADA POR EL COMPLEJO CADHERINA-CATENINA.

Las cadherinas se expresan como dímeros en la superficie celular e interactúan con otros dímeros de células vecinas. La unión es proporcionada por un grupo de tres proteínas llamadas cateninas; la alfa-, beta- y gamma-catenina que se fijan directamente al dominio citoplasmático de las cadherinas mediante su extremo amino terminal. La alfa catenina interactúa de manera concertada con otras proteínas y se fijan a los filamentos de actina. El carboxilo terminal de cadherina se extiende en el citoplasma y se une a la beta catenina o gama catenina (plakoglobina) que une los filamentos de actina en la célula.

Un sitio de la región trans membranal (TM) une la proteína relacionada a la catenina p120 que a su vez contiene 5 repeticiones de armadillo lo cual media en la interacción con cadherina. P120 es un blanco de fosforilación y la fosforilación modula las propiedades de cohesividad del ectodominio por un mecanismo desconocido (Fig. 2).

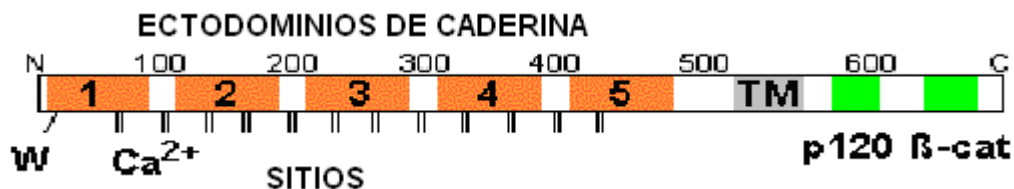


Figura 2. Adhesión mediada por el complejo cadherina-catenina (21).

Los ectodominios son ricos en Asp y Glu formando tres sitios de Ca^{2+} por dominio en las vueltas terminales de la hoja así como en el "linker", donde tres iones calcio se unen en la región del inter dominio neutralizando efectivamente la carga y cancelando la carga neta de repulsión electrostática. La unión de iones calcio incrementa la rigidez de la región extracelular (Fig.3). Esta interacción se puede interrumpir por el EDTA (agente quelante) que es comúnmente usado como un disgregante celular (21)

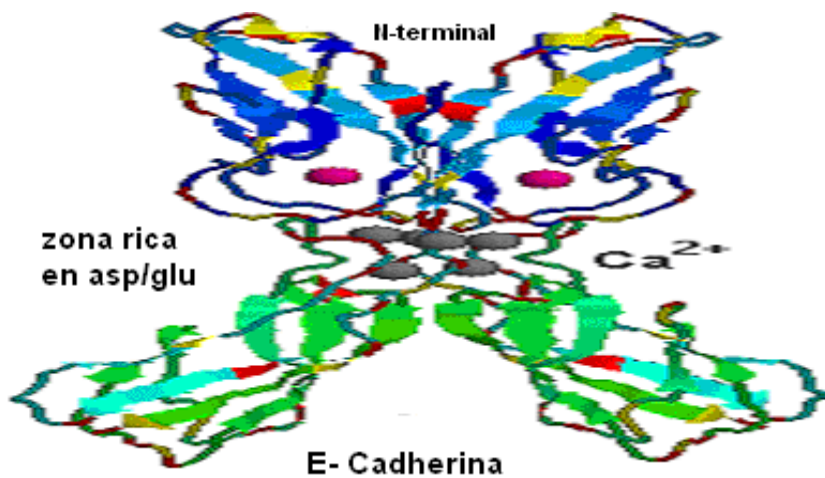


Figura 3. Representación tridimensional de los ectodominios de E-cadherina (26).

La cadherina forma grupos de contacto célula-célula en la membrana formando la función adherente entre células. La concentración local de cadherina y su función adherente ayudan a secuestrar el pool citoplásmico de beta catenina, lo que la limita para entrar al núcleo (26).

La beta catenina en el núcleo se asocia con factores de transcripción como LEF y TCF y activa la expresión de genes tales como la ciclina D1 que estimula la proliferación celular (29) como se muestra en la siguiente figura:

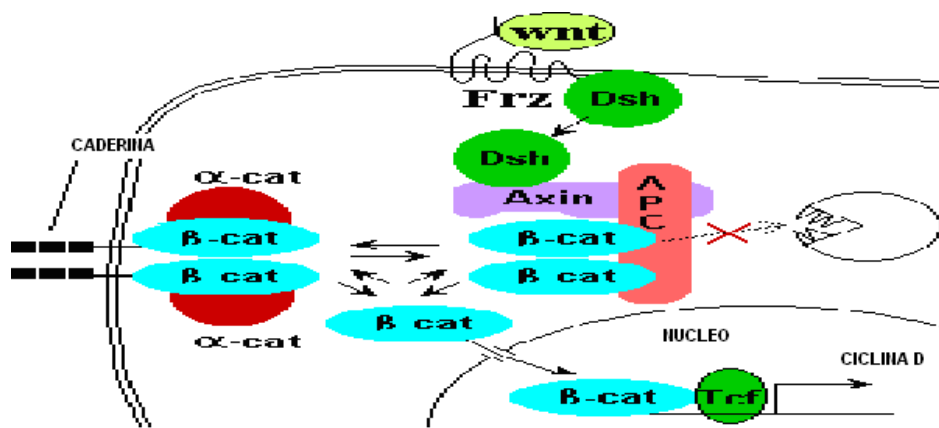


Figura 4. Representación esquemática de la interacción de beta catenina en citoplasma y núcleo (27).

La beta catenina citoplásmica se une a APC (Adenomatous Polyposis Coli) para formar un blindaje para la fosforilación por la cinasa serina /treonina GSK3. Cuando se fosforila, se activa la señal de ubiquitinación. La vía de señalización Wnt libera a los vertebrados de la proteína hidrolizada por la membrana celular, y esto desplaza a la GSK3 de APC, de lo contrario beta catenina no se destruye rápidamente (29).

La pérdida de cadherina resulta en una liberación de beta catenina en el “pool” citoplásmico, lo mismo que se observa ante la sobreexpresión de APC. Estos son dos secuestradores de la beta catenina citoplásmica, uno tiene bajo su control la adhesión celular y el otro a los factores de señalización extracelulares (23).

La mutación del gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) es responsable de la Polyposis adenomatosa familiar, una condición clínica caracterizada por cientos de pólipos en el colon, que con los años evolucionan hacia lesiones carcinomatosas. La proteína codificada por este gen regula diversos péptidos celulares, incluyendo catenina, que esta unida al dominio intracelular de E-cadherina (29).

La inactivación del gen APC produce un acumulo anormal de beta catenina y permite que ésta forme complejos con el factor de transcripción TCF-4 determinando la síntesis de ciertos genes que alteran el ciclo celular. Por otra parte, el exceso de beta catenina, en virtud de su unión con E-cadherina, altera la estructura de las zonas adherentes (Zónula adherens), que mantienen unidas las células entre sí, lo que lleva a alteraciones en los mecanismos de comunicación intercelular que van a favorecer la transformación maligna (30).

En las células que expresan el APC funcional, reprime beta catenina por proteólisis y ubiquitinación; de este modo evita la activación de beta catenina y del factor TCF-LEF de la transcripción. En las células que tienen el APC transformado, los niveles de la beta catenina se elevan, favoreciendo el desarrollo de los complejos de beta catenina/ TCF-LEF y de la activación de las capacidades del factor transcripcional de TCF-LEF (31,32).

Beta catenina actúa como oncogen, cuando se transloca al núcleo. Además se une al factor de las células T o factor linfoide amplificador y actúa como trans-activador de sus genes blanco (23). En cáncer de mama, beta catenina y otros genes de la vía de Wnt se sobreexpresan y se ha demostrado que inducen proliferación celular anormal. Se han identificado mutaciones en el gen de beta catenina en carcinoma endometrial y otros carcinomas, con acumulación anormal de beta catenina en el núcleo (32). La relación con la inestabilidad microsatelital esta poco clara. Se ha sugerido que los genes de la matriz de la metaloproteinasa 7 (MMP-7) y la ciclina D1 son blancos de la beta catenina activada (23).

Las mutaciones de beta catenina en el exón 3 fueron encontradas utilizando los métodos de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla y secuenciación del DNA. El exón 3 encierra residuos de serina/treonina los cuales son sitios de fosforilación de la GSK-3beta. El resultado sugiere que MMP-7 y la ciclina D1 pueden ser blancos de la betacatenina activada en cáncer epitelial y otros carcinomas y una señalización anormal en la vía de señalización de Wnt (33).

Beta catenina se encuentra alterado a nivel de DNA, mRNA y proteína en diversos tumores incluyendo al Tumor de Wilms, sin embargo, no hay algún estudio que demuestre que existe expresión diferencial de las isoformas del exón 16 en tejido tumoral con respecto al tejido sano.

5.6 MUTACIONES DE BETA CATENINA EN DIVERSOS CÁNCERES.

Estas mutaciones son muy específicas y se presentan en residuos del dominio amino terminal de la proteína. Estos residuos pueden ser fosforilados y juegan un rol en la desestabilización de la proteína. Las mutaciones bloquean las fosforilaciones y por lo tanto inician un incremento en la estabilidad de la betacatenina. En algunos tumores el amino terminal es eliminado (34). La tabla lista la frecuencia y la posición de las mutaciones.

Tabla 1. Mutaciones en gen *CTNNB1* o *beta catenina* diferentes tipos de cáncer (34).

Tejido	Frecuencia	S2	D3	S3	G3	I3	F3	S3	CT3	T4	T4	A4	P4	S4	L4	S4	K4	Referencia
Colorrectal	9/202				1					3				5				Samowitz
Colorrectal	2/92									1				1				Kitaeva
Colorrectal- APC mutación c/o	7/58																	Iwao
Colorrectal- APC mutación c/o	13/27			2	1					3				5				Sparks
Colorrectal HNPCC	12/28		2		2			1		2				5				Miyaki
Colorrectal MSI c/	13/53													6				Mirabelli- primdahl
Colorrectal MSI c/o	0/27																	Mirabelli- primdahl
Desmoide, esporádico	1/1									1								Shitoh
Desmoide, esporádico	22/42									10				12				Tejpar
Endometrial MSI c/	3/9		2	1														Mirabelli- primdahl
Endometrial MSI c/o	10/20		3	1	2			3		1								Mirabelli- primdahl
Gástrico, Intestinal	7/26		2	5														Park
Gástrico, difuso tipo	0/17																	Park
Hepatocelular c/HCV	9/22		3	1				3		1				2				Huang
Hepatocelular	12/35		1	1	2	1	1		1	2				2			1	Van Nhieu
Hepatocelular	6/26		2		1			1						1				De La Coste
Hepatocelular	14/75		5	1	1					1				4				Miyoshi
Hepatocelular	21/119		3	3	1	1		2		4				8				Legoix
Hepatoblastoma, esporádico	8/9				2			1						1				Jeng
Hepatoblastoma, esporádico	27/52		2		3			1		5								Koch

Hepatoblastoma	12/18		2		1					1			1								Wei
Renal, tumor de Wilms	6/40									1				2							Koesters Maiti, 2000
Meduloblastoma, esporádico	3/67			2				1													Zurawel
Melanoma	1/65													1							
Ovario, Endometrio	7/13		3	1				2		1											Gamallo
Ovario, Endometrio	3/11							2		1											Palacios
Ovario, endometrio	10/63			2	2			6													Wright
Tumores pancreáticos	0/111																				Ramaswamy
Pilomatricoma	12/16		2	4	3			2		1											Chan
Próstata cáncer	5/104		1	2						1				1							Voeller
Tiroides, anaplásico	19/31			1				13	18	2	11	4	2	1	2	9					Garcia-rostan
Endometrio, Uterino	10/76			1				2		4				3							Fukuchi

5.7 VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT Y BETA CATENINA.

Beta catenina como todas las proteínas, está sometida a una cinética de síntesis y degradación, y normalmente se encuentra en estado estacionario (36). Cuando la velocidad de síntesis es mayor que la de degradación tenemos una disponibilidad de beta-catenina citoplasmática que no está unida a la actina. Esto le permite unirse a dos factores de transcripción (TCF y LEF) que resultan activados, sufre translocación al núcleo y determina así la transcripción de una serie de genes específicos (como las ciclinas, entre otros). La activación de la beta-catenina se traduce en el núcleo como un punto final de la vía de señalización de Wnt (Fig. 5).

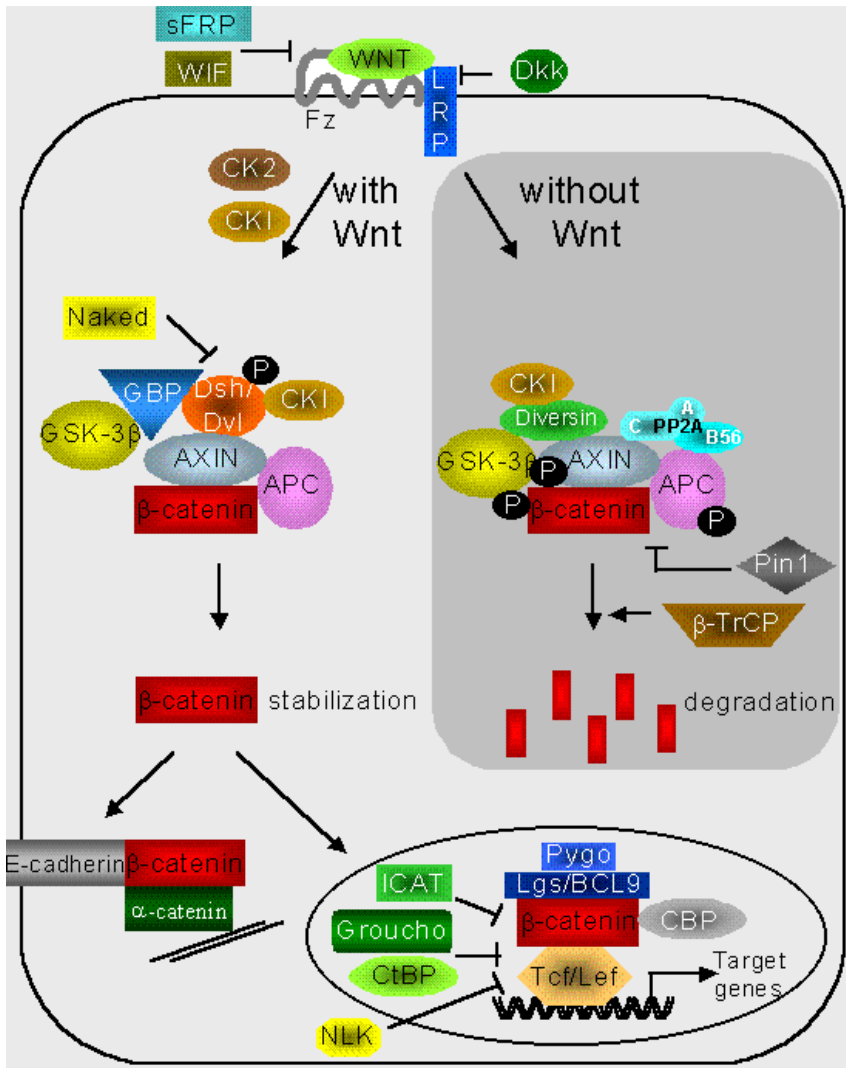


Figura 5. Vía de Señalización WNT (23).

Durante el desarrollo del riñón se expresa Wnt-4 que es una glicoproteína que actúa como un auto-inductor de la transición del mesénquima a epitelio renal en condiciones de desarrollo normal de la nefrona. La desregulación de la transformación del epitelio puede llevar a tumor de Wilms (23).

Mutaciones o pequeñas eliminaciones resultan en pérdidas de sitios de regulación de la fosforilación dentro de beta-catenina. La activación de mutaciones de la beta-catenina es un evento común en el desarrollo de tumor de Wilms y otros carcinomas, como se observa en la tabla anterior.

Estos sitios representan los sitios de fosforilación potencial de GSK-3beta en los codones 33, 37, 41 y 45. La sustitución de aminoácidos está indicada sobre la secuencia con eliminación del codón 45. (Fig. 6).

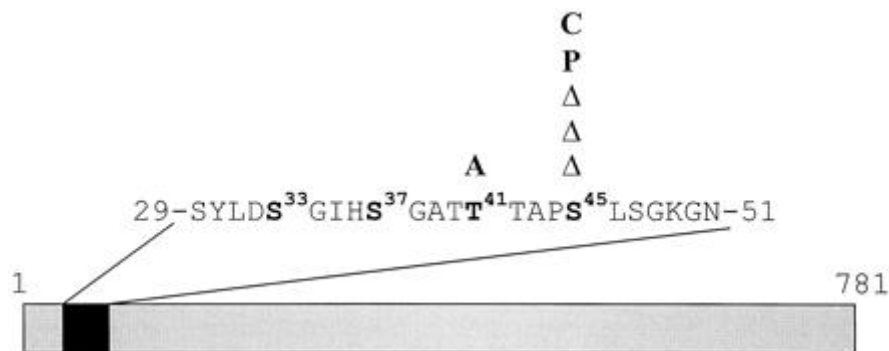


Figura 6. Representación esquemática de las mutaciones de beta catenina en el tumor de Wilms.
(<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/59/16/3880/F2>)

En el Tumor de Wilms, las mutaciones de beta catenina eliminan la funcionalidad de los sitios de fosforilación de GSK-3 beta en el extremo amino terminal (37).

Algunas mutaciones muestran una estabilización de la betacatenina y ejercen un efecto dominante en los valores de la transcripción de beta catenina/TCF. Más aun, las mutaciones encontradas en el Tumor de Wilms son idénticas a las mutaciones encontradas en otros cánceres humanos. Esto implica que la betacatenina mutada está involucrada en el desarrollo del Tumor de Wilms, y debido a que la beta catenina es un mediador corriente abajo de la señalización de Wnt-4, el hallazgo de mutaciones activadas en el gen de betacatenina en el Tumor de Wilms nos dice la importancia que la vía de Wnt tiene en el desarrollo de riñón de mamíferos (37,38).

VI.- JUSTIFICACIÓN

Debido a que se desconocen los mecanismos moleculares que inician el desarrollo del nefroblastoma y a que la proteína beta catenina tiene amplia ubicación y funcionalidad, unos propusimos a contribuir al conocimiento de la carcinogénesis embrionaria, tomando como modelo el tumor de Wilms porque recapitula el desarrollo del riñón, analizando las variantes de la expresión del gen beta catenina, en un estudio descriptivo, transversal comparativo.

VII. OBJETIVO GENERAL.

Identificar la expresión de dos isoformas del gen de beta-catenina en tumores de Wilms y compararlo con tejido aledaño y renal sin TW.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

7.1.1 Analizar la expresión de las isoformas del gen de beta catenina en Tumores de Wilms y en tejido renal sano.

7.1.2 Semi-cuantificación del cDNA beta catenina, en los tumores de Wilms por PCR en tiempo real.

VIII. HIPÓTESIS ALTERNA.

El tumor de Wilms presenta expresión diferencial de las isoformas del gen beta-catenina en comparación con tejido renal sano.

IX. MATERIAL Y METODOS

9.1. MUESTRAS.

Se estudiaron cinco tumores de Wilms y una muestra de tejido renal sin antecedentes tumorales, todos de niños mexicanos.

Las muestras se tomaron con el consentimiento informado previo del cirujano oncólogo pediatra y de los familiares responsables del paciente. Las muestras se tomaron inmediatamente después de la resección renal, con un tamaño aproximado de 3 a 5 cm. de grosor y de los mismos rangos de longitud; se recibieron en tubos de 50ml tipo Falcon y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Se hicieron alícuotas de aproximadamente 500 miligramos mismos que se mantuvieron en congelación (-70° C aprox.) en presencia de glicerol. El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

ASPECTOS ETICOS. El proyecto se sometió a evaluación del comité científico y de ética del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI y se sometió a los comités correspondientes en cada Hospital participante. Este proyecto se realizó siguiendo las recomendaciones de Helsinki para manejo de muestras biológicas de humanos y con el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la Salud.

Los pacientes y sus familiares fueron informados y se les explicó que se trata de un proyecto de investigación; ellos firmaron una carta de consentimiento proporcionada por la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana (Anexo 2) Los resultados de cada paciente se manejaron con una clave y los nombres de forma confidencial.

9.2. DESCRIPCIÓN DE LOS TUMORES.

a). WT6, obtenido de: Hospital de Pediatría CMN S XXI Servicio de Cirugía de Tumores, proveniente de paciente femenino de 7 meses con cuadro de 1 mes de evolución, aumento de volumen abdominal, astenia, adinamia. Exploración física: Abdomen globoso, asimétrico a expensas de masa localizada en hemiabdomen izquierdo de aproximadamente 14 cm. en su diámetro mayor, firme, fijo, no doloroso. TAC: masa a expensas de riñón izquierdo que rebasa la línea media y desplaza el riñón hacia delante y línea media, con áreas de necrosis, sin calcificaciones, aparentemente con la cápsula rota. Dx.: Probable tumor de Wilms
Informe de estudio Histopatológico y Citología: Tumor Renal: Nefroblastoma (Tumor de Wilms) Rabdiomatoso fetal, sin anaplasia, sin necrosis, ni atipias.

b). MAYA obtenido del Hospital de Pediatría CMN S XXI Servicio de Cirugía de Tumores, proveniente de masculino de 4 años con síndrome BWS con hidronefrosis bilateral. Mega uréter adinámico derecho operado en 1997 y reimplante ureteral tipo Cohen. Presenta orquiectomía derecha por criptorquidea. Inicia dos días previos a su ingreso con disuria, orina turbia y hematuria franca total en ocasiones con coágulos, detectándose masa abdominal, globoso con predominio del lado izquierdo a expensas de tumoración grande de aproximadamente 15 x 10 cms de consistencia firme, móvil no dolorosa. Por cirugía se extrajo el nefroblastoma de 1100g con diagnóstico Histopatológico y Citológico de Tumor de Wilms trifásico EII

c). RNC Obtenido de: Centro Médico La Raza Servicio de Oncología.
Datos Clínicos: Masculino de 1 año 2 meses, desarrollo psicomotor normal. Refiere infecciones de vías urinarias frecuentes de hasta 10 por año con pérdida de peso de 3 a 4 kg. En los últimos 5 meses, a la exploración se detecta masa abdominal con dolor durante exploración y con ganglios linfáticos.

Informe de estudio Histopatológico y Citología: Tumor de Wilms con patrón trifásico

d). WT9 obtenido de Hospital de Pediatría CMN S XXI Servicio de Cirugía de Tumores.

Datos Clínicos: Masculino con edad de 10 meses, desarrollo psicomotor normal.

Informe de estudio Histopatológico y Citología: Tumor de Wilms rabdomiomatoso fetal, arteria, vena y uretero sin tumor

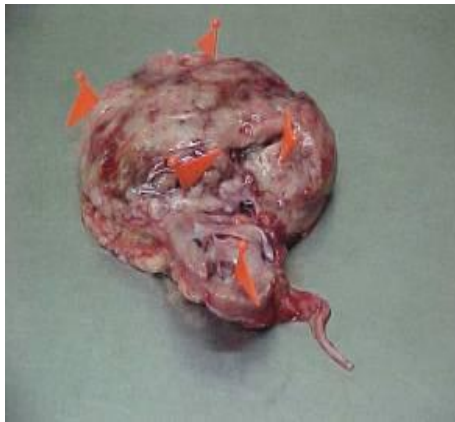


Fig 7 Fotografía de TW 3082. Las cabezas de flecha muestran zonas necróticas.

e). 3082 Obtenido de: Centro Médico La Raza Servicio de Oncología.

Datos Clínicos: Masculino de 3 años de edad, desarrollo psicomotor normal, a la exploración se detecta masa abdominal sin dolor. Informe de estudio Histopatológico y Citología. Tumor de Wilms.

f). RSANO. Tejido renal sano obtenido de un individuo sin antecedentes de cáncer.

9.3. METODOLOGIA

9.3.1. Extracción de RNA.

El RNA total se extrajo de tejidos tumoral y sano mediante el método de tiocianato de Guanidina y fenol-cloroformo (39) (TRIZOL^{MR}, Invitrogen, EUA).

PROCEDIMIENTO.

1.- El tejido renal tumoral y sano se macera hasta obtener el tejido completamente pulverizado.

Es importante mantener durante la maceración el tejido inmerso en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA y al terminar colocar la muestra en un tubo eppendorf nuevo esterilizado.

2.- Someter la muestra de tejido a centrifugación diferencial en un gradiente de ficoll-hypaque 2:1 durante 30 minutos a 5000 rpm y a 4° C.

3.- Separar la solución transparente (parte inferior) en un tubo eppendorf nuevo esterilizado. Lavar dos veces con PBS y centrifugar a 2500 rpm durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

4.- Lavar la pastilla obtenida con 200 microlitros de Trizol^{MR} por cada 100 mg de muestra e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

5.- Agregar 1.5 partes de cloroformo por una de solución y agitar fuertemente durante 10 segundos.

6.- Centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos a 4° C.

7.- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo esterilizado (ahí esta el RNA).

8.- Precipitar el RNA agregando iso propanol helado Vol. / Vol. y agitar suavemente.

9.- Centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos a 4° C y decantar el sobrenadante.

10.- Lavar la pastilla con 200 microlitros de etanol al 75% en agua tratada con DEPC. Agitar y despegar la pastilla de RNA.

- 11.- Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4° C y decantar el sobrenadante.
- 12.- Repetir una sola vez pasos 10 y 11.
- 13.- Secar la pastilla a temperatura ambiente en campana de PCR.
- 14.- Resuspender el RNA en 30-50 microlitros de agua tratada con DEPC.
- 15.- Almacenar a -70° C aproximadamente.

Una vez obtenido el RNA se procedió a cuantificarlo en un espectrofotómetro a longitud de onda de 260 y 280 nm.

9.3.2. Síntesis de Primera Cadena (cDNA).

Se realizaron amplificaciones o síntesis de primera cadena (cDNA) a partir de RNA total de cada uno de los tumores (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos de betacatenina.

Primero se realizó la transcripción inversa empleando la enzima transcriptasa reversa para obtener el cDNA a partir de RNA empleando el AMV kit (Roche) con las siguientes condiciones: 5 µg mRNA, 20 U AMV transcriptasa reversa, 10 mM dNTPs, 0.5 µg oligo dT, 2.5 mM de MgCl₂ y buffer 10x. Se utilizó un termociclador PTC 100 MJ Research con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25 ° C seguida de 60 minutos a 42° C y 5 minutos a 99° C.

Con el cDNA obtenido, se realizó las amplificaciones mediante PCR de la región comprendida entre los exones 13 al 16 para evaluar la expresión del gen de beta catenina.

9.3.3. Selección de los primers.

Los oligonucleótidos para los amplificadores fueron diseñados para este estudio, para lo cual se emplearon los programas Oligo Express, Oligo y Align a partir de las secuencias publicadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) cuyo número de acceso es: β -catenina [X89448](#), sintetizado por la compañía QIAGEN OPERON (EUA) a través de sus representantes en México.

Secuencia parcial del gen beta catenina:

```
1981 tatcagagga ctaaatacca ttccattggt tgtgcagctg ctttattctc ccattgaaaa
2041 catccaaaga gtagctgcag gggtcctctg tgaacttgct caggacaagg aagctgcaga
2101 agctattgaa gctgaggag ccacagctcc tctgacagag ttacttact ctaggaatga
2161 aggtgtggcg acatatgcag ctgctgtttt gttccgaatg tctgaggaca agccacaaga
2221 ttacaagaaa cggctttcag ttgagctgac cagctctctc ttcagaacag agccaatggc
2281 ttggaatgag actgctgac ttggacttga tattggtgcc cagggagaac cccttgata
2341 tcgccaggat gatcctagct atcgttcttt tctactctggt ggatatggcc aggatgcctt
2401 gggtatggac cccatgatgg aacatgagat gggtgccac caccctggtg ctgactatcc
2461 agttgatggg ctgccagatc tggggcatgc ccaggacctc atggatgggc tgcctccagg
2521 tgacagcaat cagctggcct ggtttgatac tgacctgtaa atcatccttt agctgtattg
2581 tctgaacttg cattgtgatt gcctgtaga gttgctgaga gggctcagg ggtgggctgg
2641 tatctcagaa agtgcctgac aactaacca agctgagttt cctatgggaa caattgaagt
2701 aaacttttg ttctggtcct ttttggtcga ggagtaacaa tacaatgga tttgggagt
2761 gactcaagaa gtgaagaatg cacaagaatg gatcacaaga tggaaattag caaacctag
2821 ccttgcttgt taaaatttt ttttttttt ttttaagaat atctgtaatg gtactgactt
```

Primer	Secuencia 5' a 3'	exón	posición
BCAT13F	AGCCACAAGATTACAAGAAAC	13	nt 2211 - 2231
BCAT16R	AGGCTAGGGTTTGCTAAATTC	16	nt 2803 - 2823

9.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se basa en la amplificación de la región específica del DNA en estudio de acuerdo a la propiedad de separación de cadenas nucleotídicas por calor, alineamiento con oligonucleótidos específicos, dNTPs y polimerización por la Taq polimerasa con su correspondiente buffer y Mg, bajo las siguientes condiciones:

La mezcla de reacción de 50 μ L se realizó con los siguientes reactivos:

- 5 μ L de Buffer 10X, (200 mM Tris HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, Gibco BRL),
- 10 μ L de cDNA ,
- 2.5 μ L de cada uno de los oligonucleótidos a 20 pM,
- 2.5 μ L dNTPs (Gibco BRL),
- 2.5 mili Molar de MgCl₂
- 0.5 U Taq DNA polimerasa (Gibco BRL).
- 22 μ L de agua desionizada esterilizada (miliQ).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Bio Systems, EUA) y se programó con los siguientes tiempos y temperaturas:

Un ciclo de 5 minutos a 94° C

seguido de 35 ciclos de:

94°C por 30 seg,

54°C por 45 seg y

74°C por 90 seg y

al final una extensión de 7 min a 74°C.

9.3.5 Purificación de los amplificados.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa a concentración de 1.5% debido a esa concentración de agarosa es adecuada por el tamaño de las bandas a obtener de 454 pb y de 613 pb.

El amplificado de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa donde corrieron durante 60 minutos a 100 volts y con un marcador de peso molecular de 123 pb. Se tiñeron con bromuro de etidio (0.1 mg/ml) y observando las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta.

Las bandas obtenidas se purificaron empleando el siguiente procedimiento de QIAGEN (EUA) y se cuantificaron espectrofotométricamente.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Cortar los fragmentos de agarosa con el amplificado (bandas) con una navaja u hoja de bisturí limpio. Minimizar la cantidad de agarosa a cortar.
- 2.- Pesar los trozos de agarosa.
- 3.- Adicionar 3 volúmenes de QG por gramo de gel.
- 4.- Incubar a 50° C por 10 minutos mezclando suavemente cada 2 o 3 minutos.
- 5.- Revisar que el color de la mezcla sea amarillo y sin agarosa. Si es violeta o naranja, adicionar 10 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.0
- 6.- Agregar un volumen de iso propanol por peso del gel (1:1)
- 7.- Colocar la columna QIAQUICK en un tubo colector y adicionar la muestra.
- 8.- Centrifugar a velocidad máxima un minuto. (Volumen máximo de la columna 800 μ L)
- 9.- Descartar el sobrenadante y volver a colocar el tubo colector.
- 10.- Adicionar 750 μ L de buffer PE con etanol a la columna, dejarlo reposar 5 minutos.
- 11.- Centrifugar a velocidad máxima un minuto.
- 12.- Descartar el sobrenadante y volver a centrifugar a velocidad máxima 1 minuto.

- 13.- Colocar la columna en un tubo limpio.
- 14.- Adicionar 50 μ L de Tris HCl pH 8.5 1 X o agua miliQ al centro de la columna y centrifugar un minuto a máxima velocidad.
- 15.- En el sobrenadante se encuentra el cDNA purificado.

9.3.6 Reacción de Secuenciación.

El marcaje de la muestra es sensible a bajas cantidades de contaminación de DNA, por ello los productos de PCR deben de estar perfectamente puros sin contaminantes que interfieran en el desarrollo de la secuenciación.

La secuenciación directa y el análisis de las muestras fueron llevados a cabo usando el aparato de Applied Biosystems modelo 370 (AP, USA).

PROCEDIMIENTO.

Preparación de la mezcla de reacción para las muestras y control DNA (pBSMB).

1. A cada una de las muestras preparar un volumen total de 20 μ L con: 10 ng/ μ l de DNA problema por cada 100 pb de, .2 μ l de primer (10 pM), 1.0 μ L de BigDye y los microlitros restantes de agua.
2. Se amplificaron con un paso inicial de 2 minutos a 94 °C y 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg y 68 °C por cuatro minutos y finalizar a 4 °C por un máximo de 45 minutos.
4. Una vez terminado se purifica con columnas Qiagen y se liofilizan las muestras. Posteriormente estas se hidratan con el colorante azul dextrán en formamida al 20%.
5. Las muestras se colocan en el secuenciador automático previamente calibrado y programado por el responsable de su operación.
6. Los resultados se obtienen en forma de electroferogramas y se compararon las secuencias con la base de datos GENE BANK.

X. RESULTADOS

10.1.- Obtención y Cuantificación de RNA.

Una alícuota de RNA obtenido de cada muestra se corrió por electroforesis obteniendo el resultado de la fig. 7 donde se observa el RNA 28S, 18S y otros RNAa

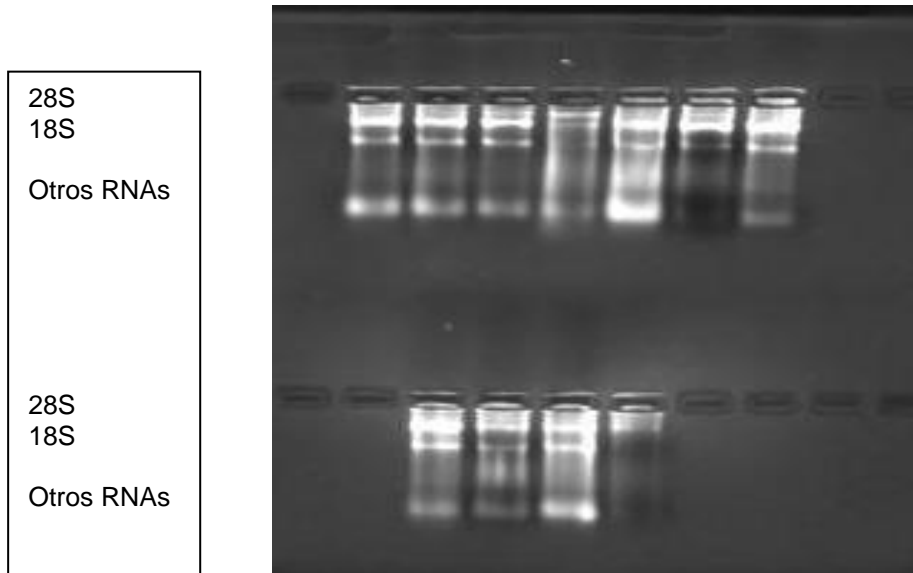


Fig 7. Electroferograma de RNAs de muestras de TW

Se obtuvo RNA entre 0.48 a 8.36 ng/ul de RNA de cada muestra de acuerdo a lo que se indica en la tabla 2.

Tabla 2 Concentración de RNA obtenido de cada uno de los tejidos:

Muestra	DO 260 nm	RNA ng/ μ L	DO 280 nm	260/280
WT9	0.209	8.360	0.105	1.990
WT6 7495	0.076	3.040	0.035	2.170
TW-Maya	0.072	0.720	0.026	2.769
TW 2472	0.018	0.480	0.006	3.000
TW 3082	0.062	2.480	0.025	2.480
RNC 7112	0.068	2.720	0.050	1.360
RSANO	0.028	1.120	0.028	1.000

10.2.- Resultados de las condiciones para la PCR.

Para establecer las condiciones optimas de la PCR se probaron temperaturas de 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, cercanas a lo informado y concentraciones de 1.0 a 2.5 mM de MgCl₂, utilizando el cDNA de WT9 (2ul en cada tubo), en un volumen final de la reacción 25 L. Los resultados se observan en la Fig. 8

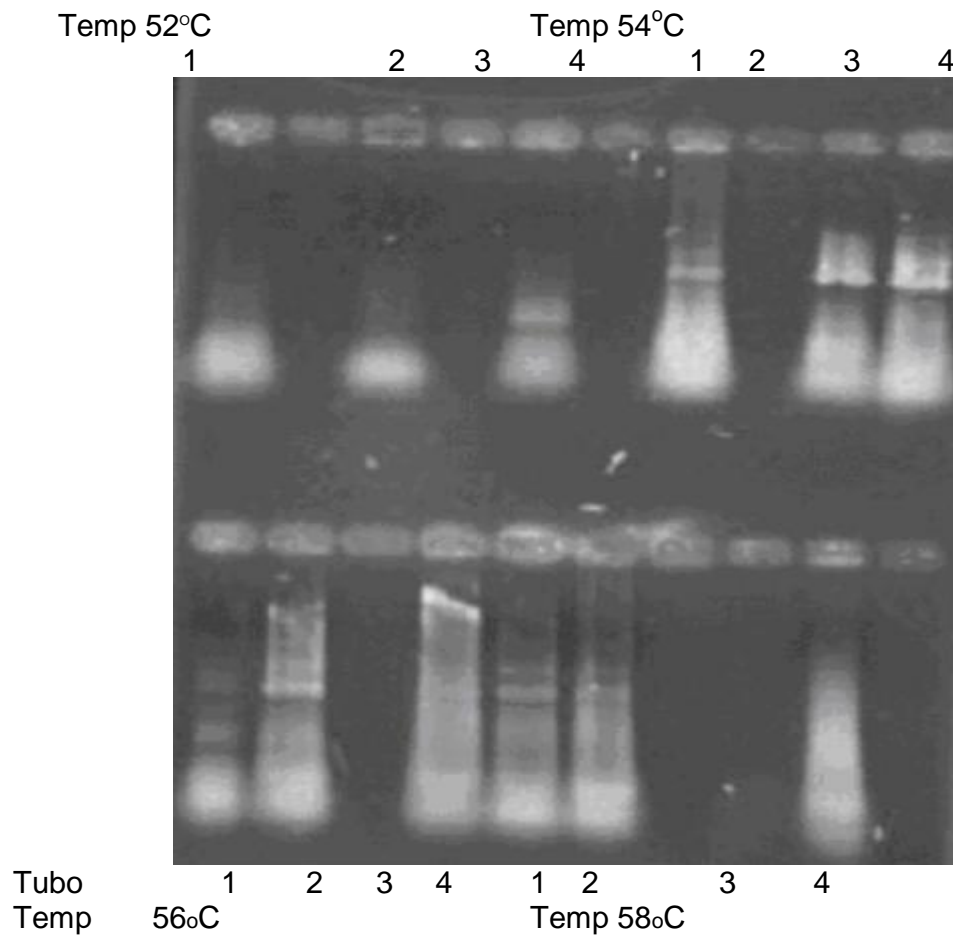


Fig.8. Estandarización de las condiciones de PCR.

Así pues se observa que las mejores condiciones de amplificación de las bandas se dan a 54° C con una concentración de MgCl₂ de 2.0 mM por lo que se decide trabajar con estas condiciones de amplificación para las siguientes reacciones de PCR. La concentración de cloruro de magnesio (de 2.0 mM) favorece la amplificación de los productos pues ya se observa la presencia de dos bandas, al parecer de las isoformas buscadas.

10.3.- Amplificación de las isoformas del gen beta catenina expresadas en las muestras analizadas por PCR.

Después de los ensayos anteriores y con las condiciones establecidas, se amplificaron regiones específicas del gen en estudio mediante PCR de los que se obtuvo la fig. 8 donde se observan dos bandas una de 454 pb y otra de 613 pb. Temperatura de alineamiento 54 °C

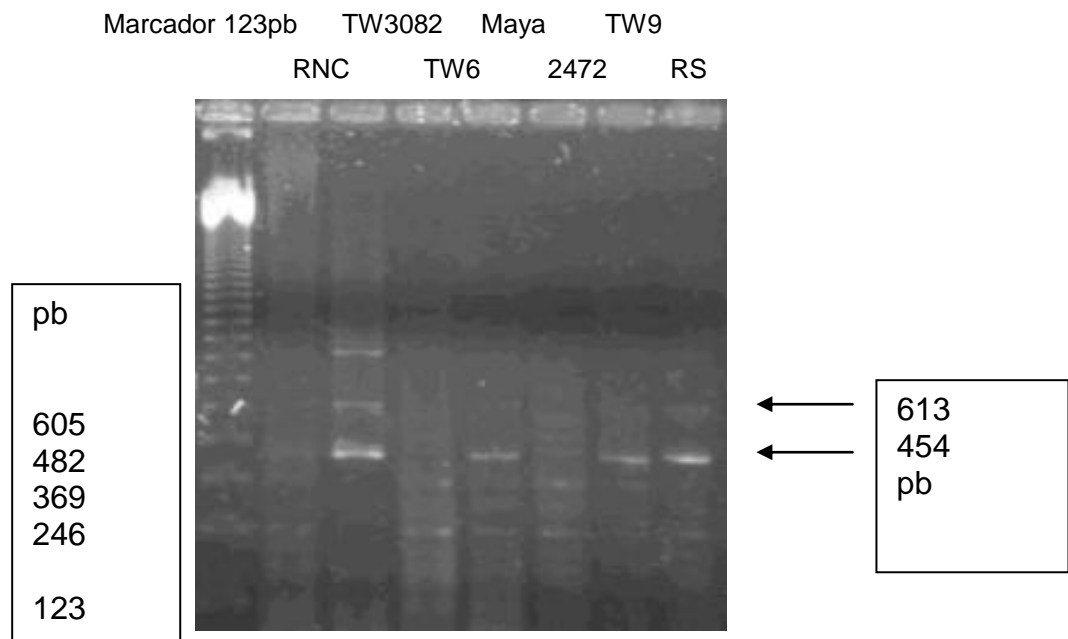
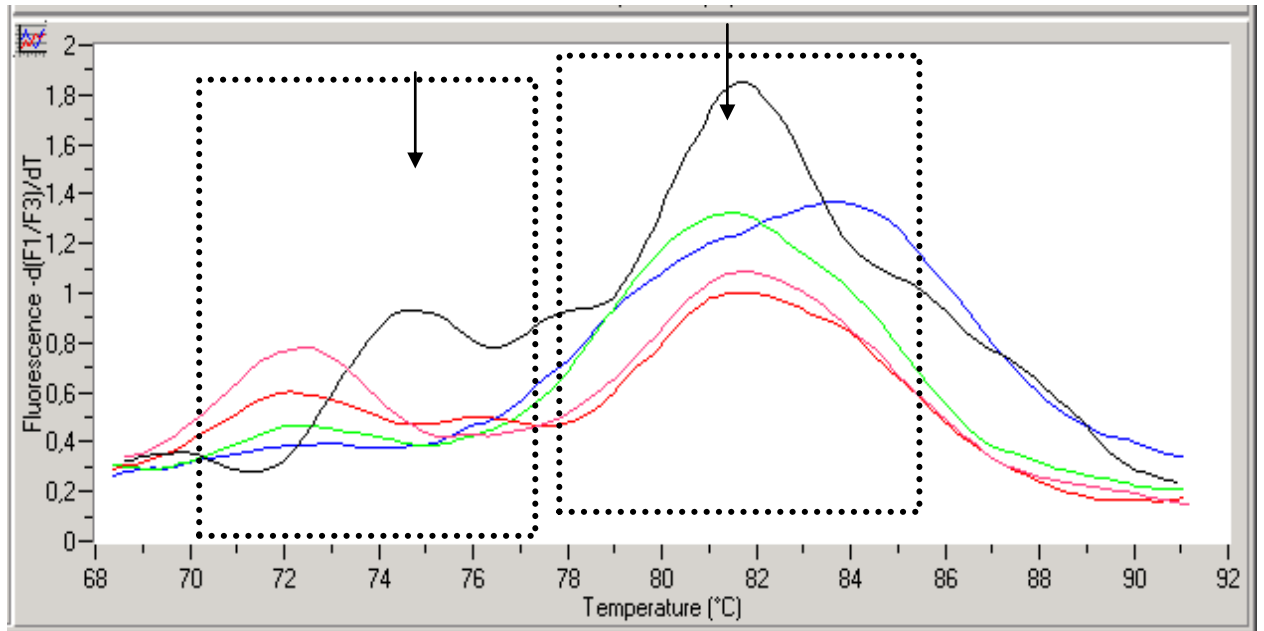


Fig. 9. Electroforesis de los productos de PCR de las muestras señlas. M= marcador de 123pb, RNC= tejido renal sano, RS= tejido renal adyacente al tumor, 3082, WT6, Maya, 2472 y TW9 = tumores

10.4 Análisis de la expresión de las isoformas 613 pb y 454 pb de beta catenina por QPCR.

Las muestras se sometieron a qPCR-en tiempo real obteniéndose las figs. 10A y B



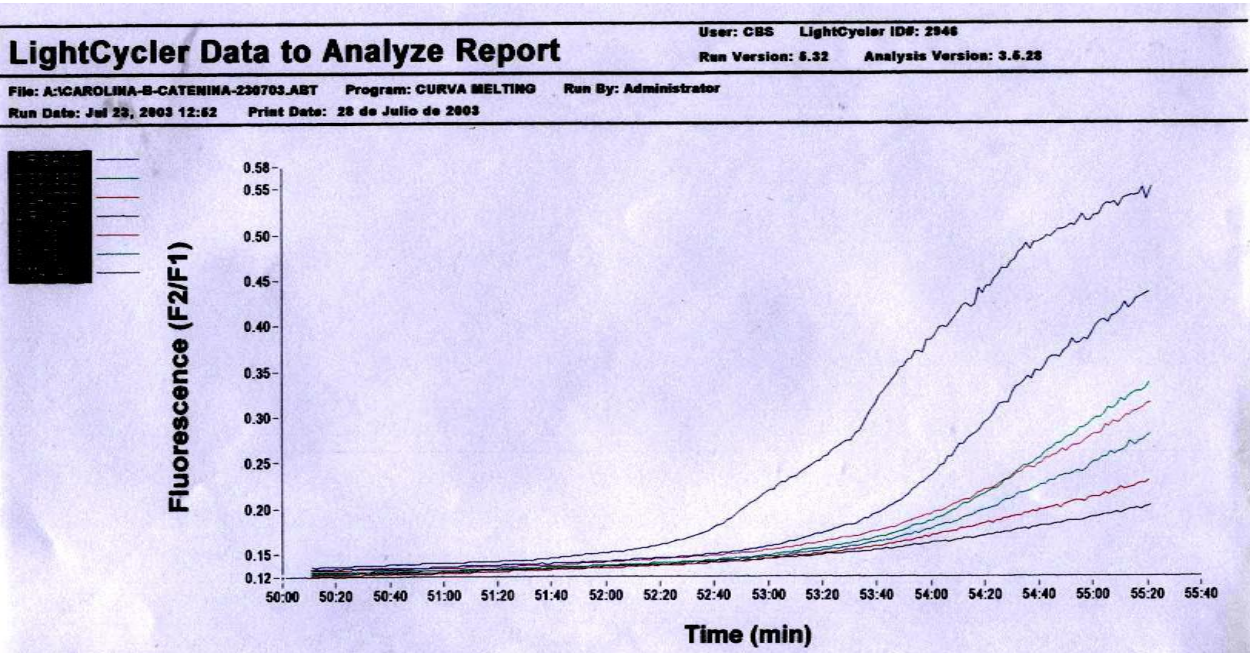


Fig. 10. Curvas de amplificación del QRT-PCR en tiempo real. A) El cuadro con línea discontinua indica la amplificación del fragmento de 613 pb y el cuadro con cruces el de 454 pb. B) curvas de incorporación de fluorescencia que nos indican la concentración de los fragmentos amplificados.

10.5 Secuenciación de la banda de 454pb.

Cada fragmento se secuenció con la finalidad de confirmar que el fragmento de 454 pb carece de los 159 pb (Fig. 11).

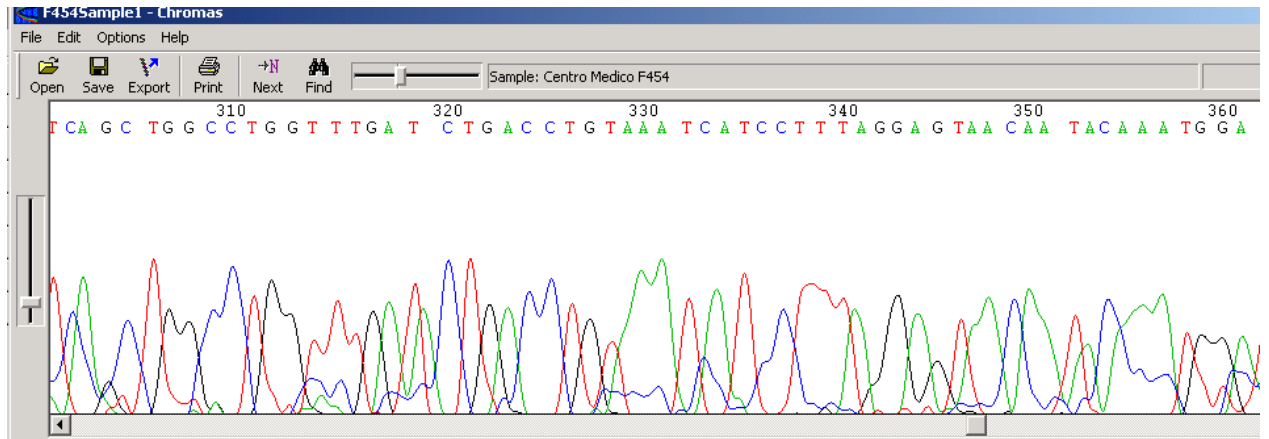


Fig. 11. Secuencia silvestre sentido que muestra el sitio receptor de corte y empalme (splicing).

```
atcatccttt ag ctgtattg tctgaacttg cattgtgatt ggctgtaga gttgctgaga  
gggctcgagg ggtgggctggtatctcagaa agtgctgac acactaacca agctgagttt  
cctatgggaa caattgaagt  
aaacttttg tctggtcct tttggtcg ag ga gtaacaa tacaatgga
```

XI.- DISCUSIÓN.

La disponibilidad de la secuencia del genoma humano, nos permite identificar aquellas porciones que son fundamentales para el desarrollo del cáncer. Ahora sabemos que existen pocos genes estructurados; de tal manera que las isoformas de estos cobran importancia, dada la complejidad fisiológica del ser humano.

En el presente trabajo demostramos que la expresión del fragmento de 454 pb (fig. 9) se encuentra en todos los tejidos analizados incluyendo el sano, lo que indica que es la forma silvestre que permanece debido probablemente a que existen una mezcla de células normales y neoplásicas. Por otra parte, sólo se observó el fragmento de 613 pb en tejido tumoral, lo que sugiere que en estos 159 pb extras están involucrados en la génesis del tumor donde pueden existir sitios de unión a proteínas importantes para el desarrollo, progresión y/o metástasis de las células malignas; o bien que esta región evite la acción sobre los genes que normalmente regula, ya que el exón 16 corresponde al dominio de trans-activación en la proteína.

Se ha informado de algunos estudios en donde dos o más variantes del mismo gen estructural juegan papeles diferentes, específicamente en la transformación neoplásica. Por ejemplo la expresión de la variante truncada HER2 (100 kDa) que codifica para un dominio extracelular de HER2 (HER-ECD) e inhibe el crecimiento de las células tumorales MCF7 en proliferación, lo que contrapone a la actividad oncogénica conocida de HER2 (40), también los tumores de hueso con células gigantes, expresan fuertemente una pequeña variante por "splicing" alternativo de MDM2 (MDM2-b) que le confiere un fenotipo neoplásico, mientras que otros tumores de hueso y células normales de hueso humano expresan predominantemente la isoforma completa (41).

Las neoplasias embrionarias son un buen modelo de estudio del cáncer por que son el resultado de uno o varios defectos génicos que se producen durante la embriogénesis. En nuestro estudio se planteó la hipótesis alternativa de observar la expresión diferencial de ambas isoformas +/- 159 en tejido de tumor

de Wilms con respecto a tejido renal sano, y se observó claramente la presencia de las mismas, en una proporción 4:1 en el tejido tumoral con respecto al sano, dato importante no antes descrito, aunque si se informó de corte y empalme alternativo (42).

Con respecto al gen beta catenina, existen dos estudios previos que informaron de una forma truncada, el primero de Oyama y cols. (43), quienes informaron de una proteína de 107 amino ácidos, 321 pb menor de lo normal en dos líneas celulares: HSC-39 y HSC40A, derivadas de cáncer de estómago, lo que llevó a la pérdida de contacto celular concluyendo que este fenómeno puede llevar a las células a invadir otros órganos. Por otra parte, Wong y cols. (44), hicieron estudios de funcionalidad de una forma truncada experimental (Beta catenina Delta-N89) encontrando incremento de apoptosis, tres a cuatro veces más frecuente de lo normal

En la estrategia metodológica además del tejido tumoral se incluyó tejido sano adyacente al tumor el cual también se comparó con tejido renal de un individuo sin antecedentes de cáncer y se observó un comportamiento diferente entre ambos tejidos esto debido a que hubo expresión de ambas isoformas +/- 159 en el tejido renal sano adyacente al tumor tal y como la hubo en el tejido tumoral lo cual se pudo haber presentado por inclusión de células neoplásicas a este tejido y dado la eficiencia y especificidad de la reacción en cadena de la PCR se obtuvieron ambas isoformas o se propone que aun tratándose de células morfológicamente sanas estas se encuentran con betacatenina alterada en todo el tejido renal que de acuerdo a análisis patológicos es sano y que sin embargo presentan la isoforma + 159.

Esto puede condicionar la progresión del tumor y su metástasis lo cual coincide con lo observado en la práctica médica del Dr. Monroy del Centro Médico La Raza (comunicación personal) y el Instituto para el Estudio Nacional de Tumor de Wilms (NSWT por sus siglas en inglés) que informan que ha mayor presencia de tejido indiferenciado peor pronóstico y a que la isoforma de +159 pb da como resultado la pérdida de sitios de regulación que se encuentran en el exon 16 de la región 5'.

Cabe mencionar que el gen de beta catenina no es el único involucrado en el desarrollo de Tumor de Wilms y además no solamente esta alterada en este tipo de tumor sino también en tumores de adultos como cáncer de colon, próstata y otros; sin embargo no se ha informado de la participación de las isoformas +/- 159 en otros tumores por lo que este trabajo es pionero en este tipo de estudios y es importante para la búsqueda de nuevos marcadores tumorales.

XII.- CONCLUSIONES.

12.1 Se observó expresión diferencial de las isoformas +/- 159 del gen beta catenina en tumores de Wilms con respecto a tejido renal sano.

12.2 En los tumores de Wilms, la isoforma -159 pb (454 pb) del gen beta catenina se expresó en proporción 4 a 1 con respecto a la isoforma +159 pb (613 pb).

12.3 Los resultados sugieren que la isoforma +159 del gen betacatenina juega un papel importante en el desarrollo del tumor de Wilms confiriéndole un fenotipo neoplásico.

12.4 Se propone continuar el estudio para conocer la función biológica de la isoforma y evaluar su posible papel como marcador tumoral.

XIII. ANEXOS

13.1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA

Hoja 1. Carta de Consentimiento Informado.

El presente estudio del Tumor de Wilms o nefroblastoma se abordará desde el punto de vista de Genética Molecular. El estudio es interesante porque la mayoría de estos tumores se presenta de forma esporádica, esto significa que no es transmitido por los padres. Para llevar a cabo el estudio, requerimos de muestras de sangre del paciente y de sus padres como control, así como de un fragmento del tumor después de la resección. La obtención de estas muestras no daña ni alterara el tratamiento del paciente. Las muestras sólo se emplearán para investigar la expresión de algunos genes y por ningún motivo se exhibirán los nombres del paciente ni de los familiares. Toda la información será estrictamente confidencial. Los resultados que se generen de este estudio serán analizados por los médicos especialistas junto con los investigadores para establecer si son de utilidad para el manejo de futuros pacientes. No se proporcionarán resultados directamente a los pacientes; sólo en los casos en los que existan alteraciones moleculares familiares donde el médico genetista dará el asesoramiento a la familia que lo requiera.

13.2 ANEXO 2 Carta de Consentimiento Informado.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA

FECHA _____

NÚM. DE REG. _____

Me han sido explicados claramente los objetivos del estudio por el responsable del proyecto. Este estudio es sólo de investigación por lo que no me serán dados resultados directamente. Autorizo la toma de muestras sanguíneas y tumorales porque no representan ningún riesgo para mi salud ni para la de mi familiar (paciente) y acepto formar parte en el proyecto de investigación ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES WT1, IGF2 Y BETA CATENINA EN NIÑOS MEXICANOS CON NEFROBLASTOMA.

NOMBRE DEL PACIENTE _____

MATRICULA _____

NOMBRE DEL FAMILIAR RESPONSABLE _____

PARENTESCO _____

FIRMA _____

XIV. REFERENCIAS

1. Fajardo A, Mendoza S, Valdez M, Mejía A, Yamamoto K. Frecuencia de Neoplasias Malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio Multicéntrico. *Biol Med Hosp Infantil Mex.* 1996; 67:1240–1245.
2. Breslow N, Beckwith J, Ciol M. Age distribution of Wilms Tumor: report from the National Wilms Tumor Study. *Cancer res* 1988; 48: 1653 – 1657.
3. Brown KW, Malik TA: The molecular biology of Wilms' tumour. 2001 <http://www-ermm.cbcu.com.ac.uk>
4. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, Heyningen V, Hastie N. The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; 346:194-198.
5. Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Striegel J, Houghton D, Junien C, Habib R, Fouser R.. Germ line mutations in the Wilms tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; 67:437-447.
6. Knudson AG, Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48:313-324.
7. Schedl A, Hastie D. Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10:543-549.
8. Nollet F, Geert B, Molemans F, Van Roy F. Genomic Organization of the Human b-Catenin Gene (CTNNB1). *Genomics* 1996; 32, 413–424
9. Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Birchmeier W, Grzeschik K, y Ballhausen W. Localization of the human betacatenina gene (CTNNB1) to 3 p21: A region implicated in tumor development. *Genomics.* 1994;23: 272-274.
10. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel M. Mutational Activation of the Beta-catenine proto-oncogene is a common event in the development of Wilms tumor. *Cancer Res.* 1999; 59: 3880 – 3882.

11. Mareel M, Berx G, Van Roy F, Bracke M. The cadherin/catenin complex. A target for antiinvasive therapy? *J. Cell Biochem* 1996; 61:524-530.
12. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000;14:1837-1851.
13. Maiti, E. Frequent association of *B- Catenin* mutations in Wilms tumor. *Cancer Res* 2000; 60:6288-6292.
14. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97:4262-4266.
15. Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Cancer Res*, 1999; 59:269-73.
16. Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y. Activation of the β -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res.* 1998; 58:2524-27.
17. Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY. Frequent somatic mutations of the β -catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res*, 1999; 5:4257-60.
18. Voeller H J, Trunica C I, Gelmann EP. β -catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 2520-2523,
19. Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996; 111:307-17.
20. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari Y, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* 1997; 17: 271-272.

21. Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol.* 2001; 154:231-43.
22. Atencia G. Un homólogo de beta-catenina en un organismo no metazoo. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros69/catenina.htm>
23. Thorstensen L, Lothe RA. The WNT signaling pathway and its role in human solid tumors. 2001. <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSingPathID20042.html>
24. Bullions LC, Levine AJ. The role of β -catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10:81-87.
25. Christofiori G, Semb H. The role of cell adhesion molecule E-cadherin as a tumor suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 73-76.
26. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer *J Clin Invest*, 2002; 109:987-991.
27. Stockinger, A. Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation dependent β -catenin transcriptional activity. *J Cell Biol.* 2001; 154: 1185-1196.
28. Daniels DL, Spink KE, Weis WI. B-Catenin: molecular plasticity and drug design. *Trends Biochem Sc* 2001; 26:672-8.
29. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 1993; 262:1731-1734.
30. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275 (5307):1787-90.
31. Sparks A. B., Morin P. J., Vogelstein B., Kinzler K. W. Mutational analysis of the APC/ β catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58:1130-34.
32. Tetsu O, McCormick F. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature (Lond.)*, 1999; 398:422-26.
33. Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y. Activation of the *β -catenin* gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas

- without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res.* 1998; 58:1021-1026.
34. Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T. Frequent mutation of *β-catenin* and *APC* genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59:4506-09.
35. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998; 125:4225-34.
36. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. *β-catenin* is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16: 3797-05.
37. Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. Deletion of an amino-terminal sequence stabilizes *β-catenin in vivo* and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4088-4096.
38. Vainio S, Muller U. Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis. *Cell* 1997; 90:975-978.
39. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1997; 162:156-159.
40. Aigner A, Juhl H, Malerczyk C, Tkybusch A, Benz C, Czubayko F. Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene* 2001; 20:2101-11.
41. Evdoku A, Atkins G, Bourale S, Hay S, Raggat L, Cowled S, Graves S, Clayer M, Findlay D. Expression of alternative spliced MDM2 transcript in giant cell tumours of bone. *Int J Oncol.* 2001; 19: 625-632.
42. Pospisil H, Herrmann A, Butherus K, Pirson S, Reich JG, Kemmer W. Verification of predicted alternatively spliced Wnt genes reveals two new splice variants (CTNNB1 and LRP5) and altered Axin-1 expression during tumour progression. *BMC Genomics.* 2006; 13:7:148.
43. Oyama T, Kanai Y, Ochiai A, Akimoto S, Oda T, et al. A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin:

a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines.
Cancer Res. 1994; 54:6282-6287.

44. Wong MH, Rubinfeld B, Gordon JL. Effects of forced expression of an NH2-terminal truncated beta-Catenin on Mouse intestinal epithelial homeostasis. J Cell Biol 1998; 141:765-777