



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Bioquímica Clínica

KRAS en adenocarcinoma ductal de páncreas; análisis de mutaciones y su frecuencia en pacientes Mexicanos

TESIS

Que para optar por el Grado de:
Maestra en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud

Presenta:
Diana Barrón Mendoza

Director de Tesis:
Dr. Jorge Meléndez Zajgla.
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Marzo 2021



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.

Dedicatoria.

A mis padres; aunque no estés con nosotros
es gracias a ti que tomé la decisión de continuar este camino.
Amigos y compañeros que jamás dudaron de mí.

Agradecimientos.

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla y todo su equipo del laboratorio de Genómica Funcional del cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica que me tomaron en su resguardo brindándome apoyo en todos los aspectos durante este tiempo. El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Genoma del cáncer de páncreas 2011-C01-161619.

Resumen.

La identificación de los genes que conducen a la carcinogénesis ha sido considerada en los últimos 35 años como el primer paso para entender los mecanismos de aparición del tumor y la evolución. Desde la identificación de la primera mutación somática en un gen del cáncer humano (G12V en *HRAS* en una línea celular de carcinoma de vejiga) casi 500 genes del cáncer se han identificado y ahora están incluidos en el Cancer Gene Census (CGC).

Estas iniciativas comparten el objetivo explícito de detectar todos los genes y mecanismos moleculares que subyacen a la tumorigénesis en todos los tipos importantes de neoplasias.

Los genomas tumorales contienen de decenas a miles de mutaciones somáticas, sin embargo, sólo unos pocos de ellos son capaces de inducir la tumorigénesis. La alteración de estos genes, denominados -drivers - (conductores) confiere ventaja selectiva de crecimiento a las células tumorales. Mientras que sólo unos pocos genes controladores están mutados frecuentemente en el cáncer, muchos otros se alteran en una pequeña fracción de los tumores. Esto hace difícil el control del cáncer.

Los adenocarcinomas ductales pancreáticos se encuentran entre las más mortíferas de las neoplasias humanas, aproximadamente el 5% los pacientes tienen una tasa de supervivencia máxima de 5 años, el resto perece antes de este periodo. Entre los genes conductores con mutaciones involucrados, *KRAS* es el más frecuente, la mayoría de los informes muestran tasas de mutación entre el 70 y el 80%. Sin embargo, la nueva investigación utilizando técnicas analíticas de alta sensibilidad, ha mostrado frecuencias diferentes, que van desde el 40% a más del 90%. Esta discrepancia podría deberse a diferencias técnicas en la metodología utilizada aunque se ha postulado que existen diferencias en las frecuencias de mutación de *KRAS* que dependen de la población de estudio. Sin embargo, no existen datos en la población latinoamericana.

Este estudio es la muestra de una patología que requiere investigaciones posteriores debido a la falta de signos y síntomas patognomónicos así como su asociación con un gene que en futuro podría ser de utilidad como marcador bioquímico para adenocarcinoma ductal de páncreas. Se identifican las variantes/mutaciones del gene *KRAS* en pacientes mexicanos para la patología ya mencionada mediante una técnica novedosa, relativamente rápida, con alta especificidad.

La frecuencia de variantes/mutaciones en pacientes mexicanos obtenida es del 45.5% lo que comprueba la hipótesis establecida en el presente estudio, sin embargo, esto nos lleva a generar mayores interrogantes que podrían contribuir a futuros estudios, por ejemplo, analizar el tipo de variantes y la población mayormente afectada pero uno de los inconvenientes con esta patología (asociado a una baja incidencia) es la falta de

información epidemiológica así como las características clínicas propias de este cáncer. El poder investigar las diferencias en las tasas de mutación podrá derivar en cambios en el diagnóstico y en la terapia de esta enfermedad.

I. ÍNDICE

Dedicatoria.

Agradecimientos.

I. Índice.

II. Abreviaturas.

1. Resumen.

2. Introducción.

2.1 El páncreas.

2.1.1. Definición de adenocarcinoma ductal de páncreas.

2.1.2. Epidemiología de adenocarcinoma ductal de páncreas.

2.1.3. Factores de riesgo para adenocarcinoma ductal de páncreas.

2.1.4. Carcinogénesis de adenocarcinoma ductal de páncreas.

2.1.5. Clasificación de adenocarcinoma ductal de páncreas (TNM).

2.2. El gene *KRAS*.

2.2.1. Función.

3. Justificación.

4. Hipótesis

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

5.2 Objetivos específicos.

6. Metodología.

6.1. Selección de muestras.

6.1.1. Criterios de inclusión.

6.1.2. Criterios de exclusión.

6.2. Análisis de derretimiento de alta resolución (High Resolution Melting; HRM).

6.2.1. Extracción de ADN.

6.2.2. Cuantificación y calidad del ADN.

6.2.3. Selección de oligonucleótidos.

7. Resultados.

8. Discusión.

9. Conclusiones.

10. Referencias bibliográficas.

II. ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

cm: Centímetros.

FFPE: Formalin-fixed, paraffin embedded. Tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina.

HRAS: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog.

HRM: High Resolution Melting. Análisis de derretimiento de alta resolución.

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

L1: Vértebra lumbar 1.

L2: Vértebra lumbar 2.

NRAS: Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog.

PanIN: Pancreatic intraepithelial neoplasia. Neoplasia intraepitelial neoplásica.

PCR: Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

RasGAPs: Ras GTPase-activating proteins. Proteínas Ras activadoras de GTPasa.

RasGEF: Ras guanine nucleotide exchange factor. Factor intercambiador de nucleótido de guanina.

T_m: Melting temperature. Temperatura de fusión.

WT: Wild-type.

1. Introducción.

1.1. El páncreas^[Fig. 1].

Para poder entender una patología debemos entender cómo está conformado el órgano o sistema a estudiar; el aspecto anatómico y funcional está claramente estudiado, sin embargo, en estudios recientes se han encontrado nuevas características de este órgano, principalmente en el aspecto celular y molecular.

El término "páncreas" proviene del griego παν (pan-todo, entero) y κρέας (carne), a su vez *kreas* deriva del indoeuropeo kreuə- (crudo); este vocablo se debe a que en un principio se creía que el páncreas estaba compuesto solamente por parénquima.

El páncreas es una glándula impar retroperitoneal que se encuentra a la altura de L1-L2, detrás del estómago, entre el bazo y duodeno, su concavidad mira hacia columna vertebral, es de color grisáceo con un peso entre 80-100g, mide 13-18cm transversalmente, 1-3cm en su diámetro antero posterior y 4-8cm de altura máxima (siendo ésta la cabeza del páncreas). Se divide en 4 porciones:

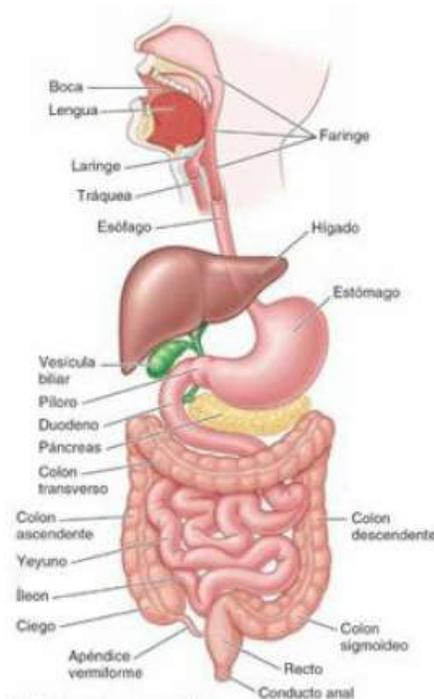


Fig. 1. Vascularización arterial y venosa de páncreas. Tomado de Moore, K. L. *Anatomía con orientación clínica*, 2013.

Localización anatómica y estructuras que lo conforman.

- **La cabeza.** Encontrándose localizada a la derecha de los vasos mesentéricos superiores y abrazada por la curva en forma de "C" del duodeno, posee una prolongación hacia la parte inferior conocida como apófisis unciforme. Se apoya posteriormente sobre la vena cava inferior, arteria y vena renales derechas y vena renal izquierda.
- **El cuello.** Se sitúa por delante de los vasos mesentéricos superiores.
- **Cuerpo y cola.** El cuerpo del páncreas inicia en el cuello, a la izquierda de los vasos mesentéricos superiores, pasa sobre la arteria aorta así como la vértebra L2; la cola del páncreas está ubicada por delante del riñón izquierdo, pasa entre las capas del ligamento esplenorrenal junto con los vasos esplénicos.^[1-5]

Fisiología.

El páncreas produce **dos tipos de secreciones**, una exócrina y una endócrina.

La **porción exócrina** está compuesta por células acinosas, mismas que sintetizan aproximadamente 1500ml/día de jugo pancreático, el cual drena a duodeno por medio del sistema que más adelante detallaré.

El páncreas es una glándula tubuloacinososa. Los acinos son redondeados y están compuestos solamente por una capa de células epiteliales piramidales, el ápice de ellas se orienta hacia la luz central. Los núcleos son redondeados y se localizan en la región basal de las células, la cual es muy basófila.

La región apical está ocupada por gránulos de zimógeno que se tiñen con colorantes ácidos, por lo que aparecen eosinófilos en las tinciones con Hematoxilina y eosina.

Sistema de secreción. La primera porción llega hasta el centro del acino y está limitada por células centroacinosas^[Fig. 1.2], las cuales son pequeñas y presentan un citoplasma claro. Las células acinosas son el único tipo celular en secretar las enzimas que más adelante mencionaré y que corresponden a este tipo de sistema.

La parte intraacinososa del sistema de conductos excretores es el comienzo de los conductos intercalares que presentan epitelio simple cúbico fuera de los acinos^[Fig. 1.3]. Los conductos intercalares drenan en conductos interlobulillares con epitelio simple cilíndrico.

Los conductos interlobulillares desembocan en dos conductos excretores.

- El **conducto pancreático** (de **Wirsung**), discurre a lo largo del parénquima del páncreas desde la cola hasta la cabeza, en esta parte da una vuelta de forma inferior, encontrándose con el colédoco y desembocando junto con él en la papila duodenal mayor; ambos (El conducto pancreático y colédoco) se unen para formar el **ámpula de Vater** la cual es corta, dilatada y desemboca en la porción descendente del duodeno, en el vértice de la papila duodenal mayor. Frecuentemente los

dos conductos desembocan en el duodeno de forma separada, durante su recorrido recibe los conductos interlobulillares casi perpendiculares al conducto (ramificación monopódica).

- El **conducto pancreático accesorio** (de **Santorini**) es inconstante. Recibe los afluentes de la parte inferior de la cabeza y transcurre hacia la parte superior, por delante del conducto de Wirsung con el que se comunica, éste último en algunas ocasiones es más pequeño que el accesorio por lo que ambos pueden no estar conectados. Si es esta la situación, el conducto accesorio transportará la mayor parte del jugo pancreático al duodeno; desemboca en la papila duodenal menor, a unos 2 cm en dirección proximal a la papila duodenal mayor.

Ambos conductos excretores están recubiertos por epitelio simple cilíndrico alto. El jugo pancreático contiene varias enzimas para degradar los componentes del alimento, así como iones bicarbonato para la neutralización del quimo gástrico.

El esfínter del conducto pancreático, el esfínter del conducto colédoco y el esfínter de la ampulla (esfínter hepatopancreático o de Oddi; localizado alrededor de la ampulla de Vater) son esfínteres que controlan el flujo de bilis y de jugo pancreático hacia la ampulla de Vater, su importancia radica en imposibilitar el reflujo del contenido del duodeno hacia la ampolla.^[1-9]

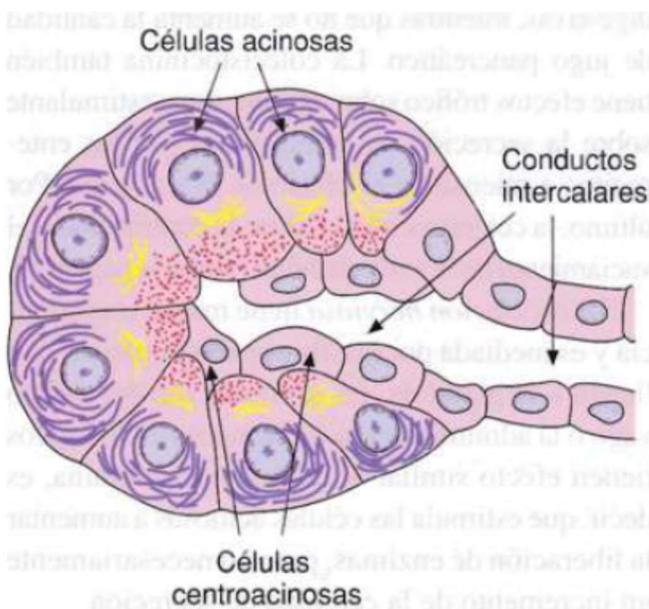


Fig. 1.1. Las células centroacinosas representan la primera parte intraacinososa de los conductos intercalares en el páncreas.^[9]

Tabla 1. Enzimas secretadas por células acinosas así como la acción que ejercen de forma general.

Enzimas secretadas por células acinosas. ^[10-14]	
Enzima(s).	Acción que ejerce.
Tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, pepsina.	Proteólisis.
Ribonucleasa y desoxirribonucleasa.	Degradación de ácidos nucleicos y nucleoproteínas.
Amilasa pancreática.	Hidrólisis de hidratos de carbono (Excepto celulosa).
Lipasa pancreática.	Hidrólisis de triacilgliceroles, ácidos grasos libres.
Colesterol esterasa.	Degradación de ésteres de colesterol.

Las enzimas proteolíticas son sintetizadas y secretadas como proenzimas inactivas, se activan en la luz intestinal por acción de la enzima enterocinasa, activando así el tripsinógeno a tripsina, que a continuación hace lo propio con las demás.^[9]

Algo muy importante e interesante que realiza la glándula para impedir su autodigestión es el acumular enzimas como precursores inactivos en gránulos de zimógeno; a diferencia de la pancreatitis aguda, donde existe una activación de las proenzimas dentro de las células glandulares o en los conductos secretores, causando la degradación del tejido pancreático.

Las células centroacinosas se encargan de secretar bicarbonato al jugo pancreático así como agua que lo acompaña en gran cantidad. El jugo pancreático alcalino es causante de neutralizar el ácido del quimo.

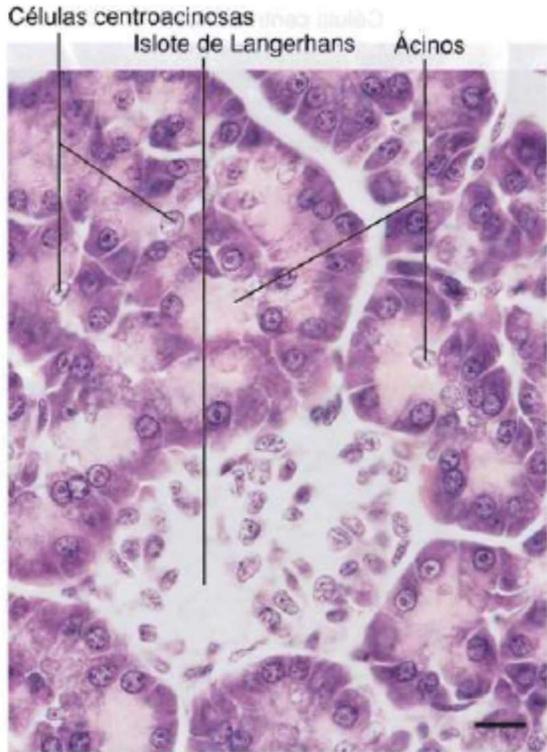


Fig. 1.2. Microscopía óptica del páncreas, muestra acinos exócrinos y un islote de Langerhans el cual presenta un aspecto bastante uniforme de las células de los islotes Barra: 10 μm .^[7]

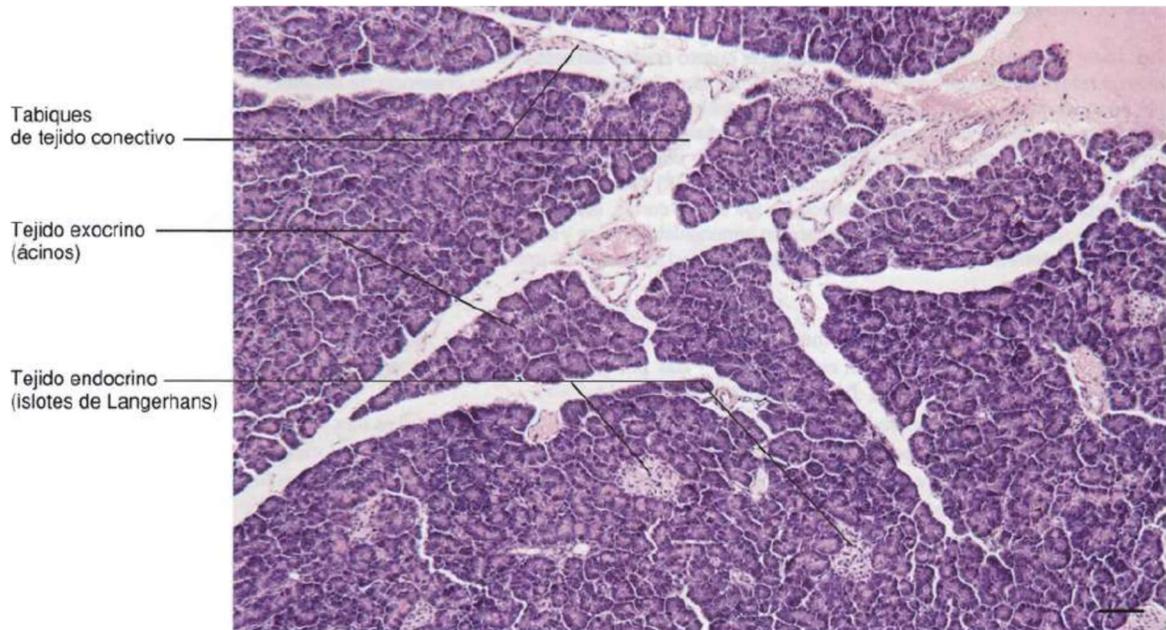


Fig. 1.3. Distribución de tejido exócrino y endócrino. Barra: 100 μm .^[9]

1.1.1. Definición de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Antes de describir la patología de mayor interés en este manuscrito, es necesario iniciar con la definición de una palabra que engloba muchos subtipos, síntomas y síndromes.

Cáncer. Proviene del latín *cancer* (cangrejo, tumor), término que probablemente se relaciona con el griego *καρκίος* (carcinos-cangrejo) y el sánscrito *karkah* (cangrejo), así como la raíz indoeuropea *kar-* (duro).

De acuerdo a la Real Academia Española, su definición es " Enfermedad que se caracteriza por la transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada". Lo interesante del término es que para el siglo IV a. C. Hipócrates y Galeno ya empleaban la palabra "carcinosis" para describir tumores.

Existen varias teorías del por qué se utilizó el término "cangrejo", una de ellas es por la dureza de los tumores semejante al caparazón de los cangrejos; otra, por la metástasis que genera y su similitud a las patas y pinzas del crustáceo al ramificarse, la última por la tenacidad de la enfermedad para con el paciente y así del crustáceo con sus pinzas al aferrarse a su presa.

De acuerdo a la OMS, el 63% de las muertes anuales a nivel Mundial son causadas por enfermedades no transmisibles y generalmente crónicas, las cuales incluyen enfermedades cardiovasculares, respiratorias, la diabetes y el cáncer; juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año, el 75% de éstas defunciones se concentran en países de bajos y medianos ingresos.

Solo en 2012 se registró una incidencia de alrededor de 14 millones de casos y se prevé que aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. Es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones a nivel Mundial y casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta patología.^[14]

Debido a las estadísticas tan alarmantes, es necesario seguir con investigaciones para entender aún mejor los distintos tipos de neoplasias que existen y así brindar mejores opciones de tratamiento a pacientes con estas patologías.

En el páncreas, existen distintos tipos de neoplasias. Estas se clasifican de acuerdo al tipo o tipos celulares involucrados, secreción y localización de las mismas; en general, por cada tipo celular que posee el páncreas, se describen uno o varios tipos de neoplasias homólogas.^[14,15]

Los componentes celulares del páncreas pueden agruparse en 6 grandes categorías:^[15]

- Acinares.
- Ductales.
- Islote de Langerhans.
- Células ambiguas (menos diferenciadas, células centroacinares).
- Células de soporte (elementos de tejido conectivo).
- Células potenciales ("madre").

Tabla 1.1.1. Algunos tipos de neoplasias pancreáticas y sus características generales.
Con información de *Lowy, A., et al. Pancreatic Cancer, 2008.*

Neoplasia.	Características generales.
Carcinoma de células acinares.	Frecuencia 1-2% de neoplasias pancreáticas, prevalencia en la 7ª década de la vida y género masculino; sintomatología no específica, genera elevación de alfa-fetoproteína. Metástasis a hígado en etapas iniciales.
Carcinoma ductal de páncreas.	Neoplasia más frecuente del páncreas, ductos pancreáticos son el componente menos desarrollado de la glándula, único componente del páncreas expuesto a mutágenos, en neoplasias mucinosas intraductales pueden detectarse oncoproteínas y glicoproteínas relacionadas con mucina (MUC1, CA19-9, CEA, and DUPAN).
Tumores endócrinos pancreáticos.	Baja frecuencia. Conocido anteriormente como tumor de células de los islotes, generalmente son tumores sólidos, circunscritos y gruesos, se nombran de acuerdo a la hormona involucrada: Insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, somatostatina, VIPoma (Péptido intestinal vasoactivo, etc.). Malignidad se divide en baja e intermedia dependiendo la tasa mitótica y necrosis.
Tumor sólido pseudopapilar.	Frecuencia baja. Se desconoce su origen celular, tumor grande (8-10cm) predomina en mujeres jóvenes (<25 años), simula un pseudoquistes pancreático, curativo si se realiza resección completa de la neoplasia, su fatalidad es rara.

Es la neoplasia con el mayor índice de fatalidad de todos los tipos de cáncer que existe, la supervivencia del mismo a 5 años apenas alcanza el 6% y esto puede deberse a la sintomatología poco específica y el diagnóstico de la patología (generalmente como hallazgo) en etapas avanzadas.

A nivel macroscópico se puede observar una tumoración fibrosa con bordes mal definidos, a nivel microscópico se observan elementos glandulares que asemejan los conductos sin alteraciones, en ocasiones un páncreas sin esta patología presenta epitelio ductal con atipia.

Las células son típicamente cuboidales con una cantidad variable de citoplasma que contiene mucina y glicoproteínas relacionadas con la mucina, ocasionalmente pueden existir patrones distintivos tales como "glándula espumosa" (con mucina hinchada, alterada), "claras" (glucógeno abundante). Se presenta infiltración insidiosa, heterogeneidad tumoral (mezcla de tejido glandular y sólido) así como inestabilidad genética.

Una característica especial de la patología es la presencia de estroma desmoplásico^[Fig. 1.1.1] (adherencias o tejido conjuntivo fibroso dentro del tumor).^[9, 14, 15]

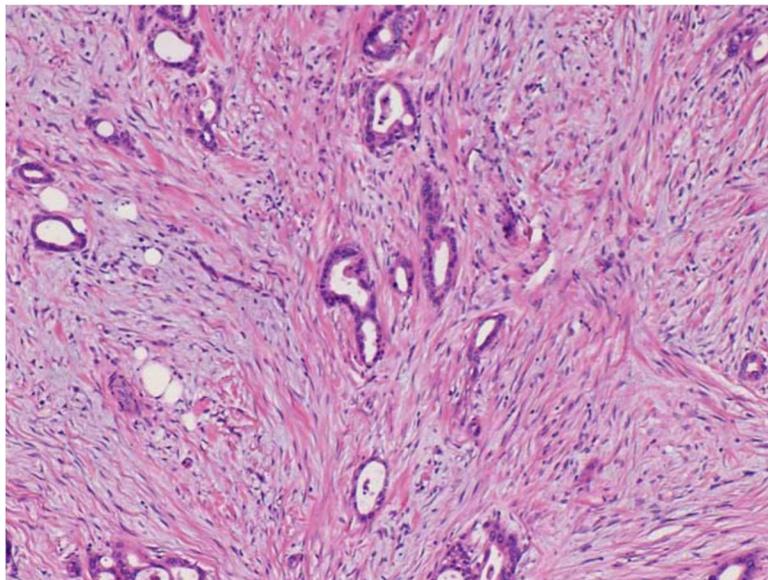


Fig. 1.1.1. Estroma desmoplásico. Tomado de *Lowy, A., et al. Pancreatic Cancer, 2008.*

1.1.2 Epidemiología de adenocarcinoma ductal de páncreas.

La Sociedad Americana de Cáncer estima que en 2017, cerca de 53,670 personas serán diagnosticadas con cáncer de páncreas (27,970 hombres y 25,700 mujeres), en este mismo año, la mortalidad será de 43,090 personas (predominantemente hombres).

En Estados Unidos, es la tercer causa de muerte de todos los tipos de cánceres (en 2015 se encontraba en el 4to lugar).

Es más frecuente en hombres que mujeres con una relación 2:1 y el riesgo de presentar la enfermedad aumenta conforme la edad, en términos generales, personas mayores de 70 años poseen un riesgo de presentación del 1.3%.^[16]

INEGI en 2010 reportó 74,685 muertes por cáncer en la República Mexicana, lo que representa el 13% de todas las muertes en México, de las cuales 3,393 (4.8%) son por Adenocarcinoma Pancreático; esto lo ubica en el 8º lugar en nuestro país.

Como podemos observar, no es la neoplasia más frecuente en población mexicana, sin embargo, si la más fatal con un índice de fatalidad de 0.96^[Fig. 1.1.2].

Desafortunadamente en nuestro país no se cuenta con estadísticas oficiales pero de acuerdo a las muestras de pacientes para este proyecto, la mayor parte son del género femenino y la edad de presentación es menor a los 40 años.

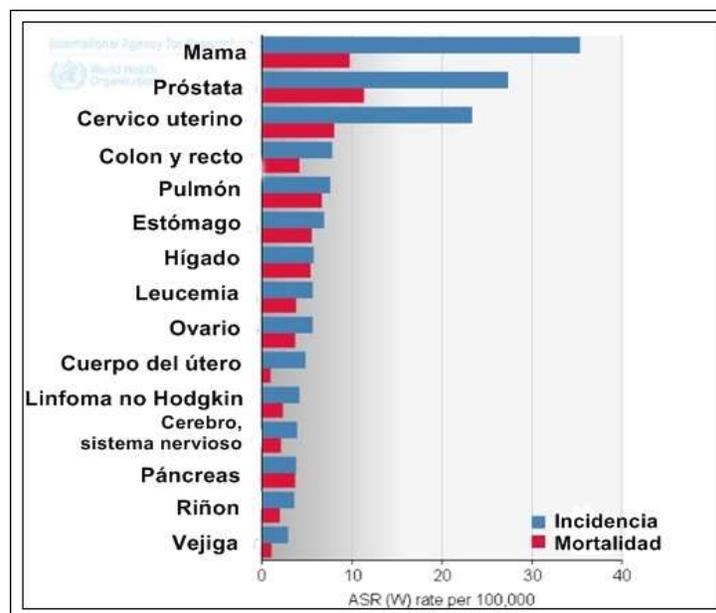


Fig. 1.1.2. Incidencia de las neoplasias más frecuentes en México, nótese la incidencia/mortalidad en páncreas. GLOBOCAN 2008.

1.1.3. Factores de riesgo para adenocarcinoma ductal de páncreas.

Existen factores de riesgo heredables y no heredables.

Tabla 1.1.3. Factores de riesgo no heredables para cáncer de páncreas.^[17]

Factores de riesgo no heredables.	Riesgo para cáncer pancreático.
Edad >70 años.	1.3
Tabaquismo.	1.6-2.5
Diabetes.	Diabetes mellitus tipo I, 2 Diabetes mellitus tipo II, 1.8
Pancreatitis crónica.	18.5-26.3
Obesidad	1.72

Exceptuando edad, el resto son factores prevenibles para esta neoplasia.

El tabaquismo es uno de los principales factores de riesgo asociado a cáncer de páncreas, puede aumentar el riesgo de padecerlo hasta 2.5 veces más que una persona no fumadora y se ha demostrado que hasta 10 años después de suspender este hábito, el riesgo persiste. Es dosis dependiente y se asocia también como factor de riesgo (entre otros) de padecer pancreatitis crónica.

El cáncer de páncreas es frecuente en pacientes con diabetes mellitus, los estudios se han enfocado un poco más en el tipo II ya que tras su diagnóstico, la frecuencia de presentar alguna neoplasia pancreática se eleva hasta un 50% en los primeros 5 años. Lo complicado reside en no existir un tamizaje para hiperglucemia que pueda incluir algún marcador en pacientes sin diabetes mellitus tipo II, la razón es por la heterogeneidad de las neoplasias y algunas de ellas causantes de hiperglucemia. Existen algunas hipótesis que mencionan la diabetes mellitus tipo II precede al cáncer pancreático debido a las alteraciones celulares y disfunción de los islotes de Langerhans.^[17]

La pancreatitis crónica es una enfermedad progresiva e inflamatoria del parénquima pancreático que lo destruye hasta generar cambios histológicos (permanentes) como fibrosis, esta es una de las principales diferencias con pancreatitis aguda, en la cual los cambios tisulares son reversibles tras la recuperación. Dentro de sus causas principales se encuentra el consumo de alcohol, tabaquismo, algunos hidrocarburos, medicamentos, obstrucción del conducto de Wirsung así como causas autoinmunes, entre otras.^[17-19]

Procesos inflamatorios, necrosis e incremento de la grasa de páncreas se han relacionado con la obesidad y el diagnóstico de ésta ($IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$) aumenta el riesgo hasta en un 72% de padecer cáncer de páncreas.^[17]

Tabla 1.1.3.1. Factores de riesgo heredables para cáncer de páncreas.^[17]

Factores de riesgo heredables.	Riesgo relativo para cáncer pancreático.
Pancreatitis hereditaria.	52
Fibrosis quística.	31.5
Síndrome Peutz-Jeghers.	132
Cáncer colorrectal no polipósico hereditario con mutación <i>MLH1</i> .	<6
Síndrome de melanoma familiar atípico con molas múltiples.	13.1
Cáncer de mama y ovario hereditarios.	Portadores de BRCA1, 23.1 Portadores de BRCA2, 5.9-6.6
Carcinoma pancreático familiar.	6.4-32

Estos síndromes son raros, sin embargo, en pacientes con diagnóstico ya establecido de alguno de ellos se deben realizar tamizajes regulares para prevenir cáncer de páncreas.

En las siguientes patologías podemos encontrar la relación que presentan con adenocarcinoma ductal de páncreas.

La pancreatitis crónica es generada por episodios recurrentes de pancreatitis aguda, llegando al punto donde ya existen lesiones y cambios histológicos en el páncreas; la pancreatitis hereditaria es una pancreatitis crónica de diagnóstico en la juventud. Es una enfermedad autosómica dominante con penetrancia del 80%, frecuentemente se asocia al gene del tripsinógeno catiónico (Protease, Serine 1; *PRSS1*) el cual si presenta algún tipo de mutación, activará la tripsina, lo que provocará autodigestión del páncreas. Otro gene asociado es el inhibidor de la proteasa de serina, Kazal tipo 1 (serine protease inhibitor Kazal type 1; *SPINK1*) el cual se asocia a pancreatitis crónica en niños y pancreatitis idiopática.^[17,19]

Una enfermedad frecuente que causa alteraciones en el páncreas es la fibrosis quística; debido a una mutación en el gene regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; *CFTR*) el cual se encarga de regular el líquido sobre las superficies epiteliales a través de la secreción de cloruro e inhibición de la absorción de sodio, genera alteración en las secreciones, los órganos principalmente afectados son los pulmones y el sistema conductor del páncreas. Al ser las secreciones más viscosas, causa obstrucción en el páncreas, lo que genera inflamación, daño tisular y destrucción del mismo.^[20,21]

Otra patología asociada a neoplasias en páncreas (entre otros tipos) es el síndrome Peutz-Jeghers, ésta enfermedad rara se hereda de forma autosómica dominante y presenta alta penetrancia; hasta el momento se conocen poco más de 145 mutaciones en la línea germinal del gene serina/treonina cinasa (serine/threonine kinase; *STK11*) que se encarga de la proliferación y polaridad celular. Este síndrome se caracteriza por pólipos hamartomatosos en el tracto

gastrointestinal, lesiones pigmentadas mucocutáneas y es un factor de riesgo para cáncer gastrointestinal y cáncer de páncreas.^[17, 22-26]

Estas son algunas de las patologías hereditarias más frecuentemente asociadas a cáncer de páncreas.

1.1.4. Carcinogénesis de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Sabemos que el término "cáncer" produce miedo, angustia y una serie de situaciones que desalientan a los pacientes desde su diagnóstico hasta el tratamiento e incluso el pronóstico, tanto para el paciente como para los familiares. Es importante conocer la carcinogénesis de cada patología para poder ofrecer alternativas médicas menos agresivas y más eficientes. Esa es una de las razones por las que nos interesa conocer a nivel biológico, molecular y celular los diferentes tipos de cáncer.

La carcinogénesis del adenocarcinoma ductal pancreático inicia, de manera general, con el crecimiento anormal de una célula clonal debido a una mutación en el gene conductor (driver gene), el microambiente generado por estos cambios y la producción de células neoplásicas metastásicas. Estadísticamente, un paciente sin antecedente familiar de este tipo de neoplasia, presenta una mutación en el gene conductor hasta 20 años previos al diagnóstico; en pacientes con neoplasias familiares se presenta con una diferencia de 5 años o menos.^[27]

De forma generalizada, la progresión^[Fig. 1.1.4] del adenocarcinoma ductal pancreático se divide de la siguiente manera: Epitelio normal, Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), adenocarcinoma ductal de páncreas, metástasis.

Tabla 1.1.4. Progresión histológica del adenocarcinoma ductal de páncreas.^[28]

Epitelio sin alteración.	PanIn-1A.	PanIn-1B.	PanIn-2.	PanIn-3.	Adenocarcinoma ductal de páncreas.
<ul style="list-style-type: none"> • Pocas células cuboidales. • Capa celular única. 	<ul style="list-style-type: none"> • Células elongadas. • Producción de mucina. 	<ul style="list-style-type: none"> • Arquitectura papilar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anormalidades nucleares como agrandamiento y pérdida de polaridad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Atipia nuclear severa. • Mitosis anormal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento invasivo. • Desmoplasia.

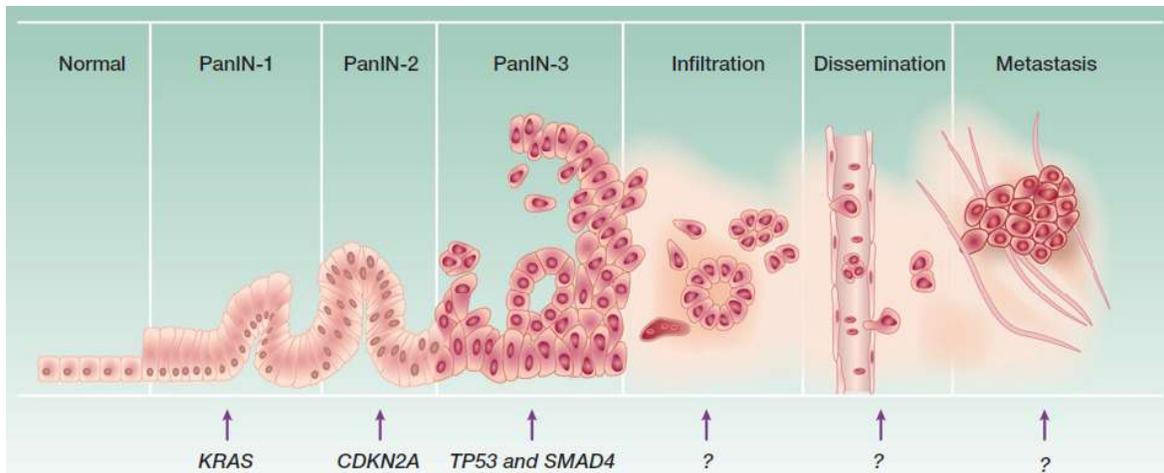


Fig. 1.1.4. Progresión genética de Adenocarcinoma ductal de páncreas.^[29]

Como consenso general, las neoplasias intraepiteliales pancreáticas son el punto clave donde podría haber una cura para adenocarcinoma ductal pancreático, sin embargo su diagnóstico es difícil ya que no presenta una sintomatología que oriente al mismo.^[29]

Los genes fuertemente asociados con la progresión del adenocarcinoma ductal pancreático y el porcentaje en el que se han encontrado, son los siguientes:

Tabla 1.1.4.1. Genes asociados con la progresión histológica del adenocarcinoma ductal de páncreas.^[29, 30]

Gene.	Localización.	Alteración.	Porcentaje.
<i>KRAS</i>	12p	Activación.	90%
<i>P16/CDKN2A</i>	9p	Inactivación.	95%
<i>TP53</i>	17p	Inactivación.	75%
<i>SMAD4</i>	18q	Inactivación.	55%

1.1.5. Clasificación de adenocarcinoma ductal de páncreas (TNM).

Tabla 1.1.4. Estadios de Adenocarcinoma ductal de páncreas de acuerdo a clasificación por tumor, nódulo y metástasis (TNM).^[32,33]

Etapa	Etapa del Tumor		Metástasis a ganglios regionales		Metástasis a distancia	
			N0	N1	M0	M1
Etapa 0	Tis	Carcinoma in situ	N0	Ninguno	M0	Ausentes
Etapa IA	T1	Tumor ≤ a 2cm y confinado a páncreas	N0	Ninguno	M0	Ausentes
Etapa IB	T2	Tumor >2cm y confinado a páncreas	N0	Ninguno	M0	Ausentes
Etapa IIA	T3	Extensión más allá de confines de páncreas sin infiltración al tronco celiaco o a la A. Mesentérica Superior	N0	Ninguno	M0	Ausentes
Etapa IIB	T1	Tumor ≤ 2cm y confinado al páncreas	N1	Presentes	M0	Ausentes
	T2	Tumor >2cm y confinado a páncreas	N1	Presentes	M0	Ausentes
	T3	Extensión más allá de confines de páncreas sin infiltración al tronco celiaco ni a la A. Mesentérica Superior	N1	Presentes	M0	Ausentes
Etapa III	T4	Infiltración al tronco celiaco o a la A. Mesentérica Superior	N0	Ausentes o	M0	Ausentes
			N1	presentes		
Etapa IV	T1 aT4	Ya descrito	N0	Ausentes o	M1	Presentes
			N1	presentes		

1.2. El gene *KRAS*.

A pesar de conocerse de muchas formas, su nombre referido en la mayoría de los artículos y bases de datos (como Genecards.org) es "Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"; pertenece a una familia de genes conocidos como "ras", los cuales fueron identificados originalmente como oncogenes en retrovirus de transformación agudas, en el caso de *KRAS*, en sarcoma de roedores, de ahí su nombre.^[34]

Se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, sub-banda 1 de la banda 12: **12p12.1**^[35]

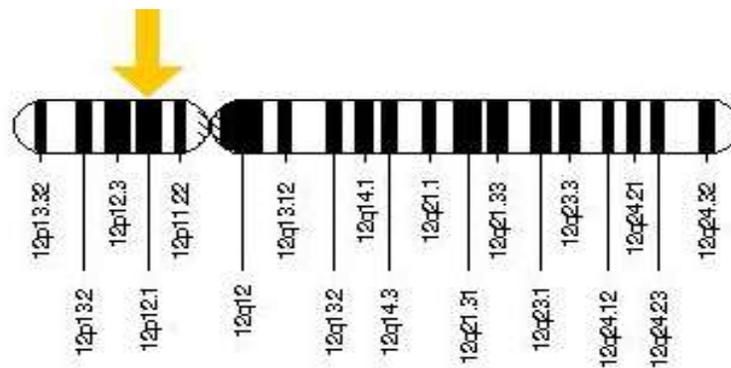


Figura 1.2. Localización del gene *KRAS* en el cromosoma 12.^[35]

1.2.1 Función.

Como ya se mencionó, pertenece a la familia de protooncogenes ras, la cual incluye los genes *H-RAS* y *N-RAS*. Estos genes codifican 4 GTPasas de pequeño tamaño que se localizan en cara interna de membrana plasmática: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B; ésta última asociada de forma directa con el transcrito de tejido pancreático, son homólogas entre sí en casi 90% de su secuencia. Se encargan de regular vías responsables en el crecimiento y proliferación celular.^[36]

K-Ras "Wild type" fluctúa de un estado activo ligado a GTP, a un estado inactivo ligado a GDP; en células quiescentes sin alteración se encuentra la mayor parte del tiempo ligado a GDP. Tras estimulación del factor de crecimiento, promueve la activación del factor intercambiador de nucleótido de guanina de ras (RasGEF) lo que conlleva a un estado K-Ras-GTP. El ciclo se termina por la acción de proteínas Ras activadoras de GTPasa (RasGAPs), regresando a K-Ras a un estado

GDP inactivo. El cambio en un solo aminoácido en G12, G13 o Q61 deterioran la unión intrínseca de GTP y la actividad hidrolítica de K-Ras, provocan también que la proteína sea insensible a la estimulación de GAP, favoreciendo la unión a GTP y una proteína K-Ras activa en el adenocarcinoma ductal pancreático.^[30, 31, 32, 37]

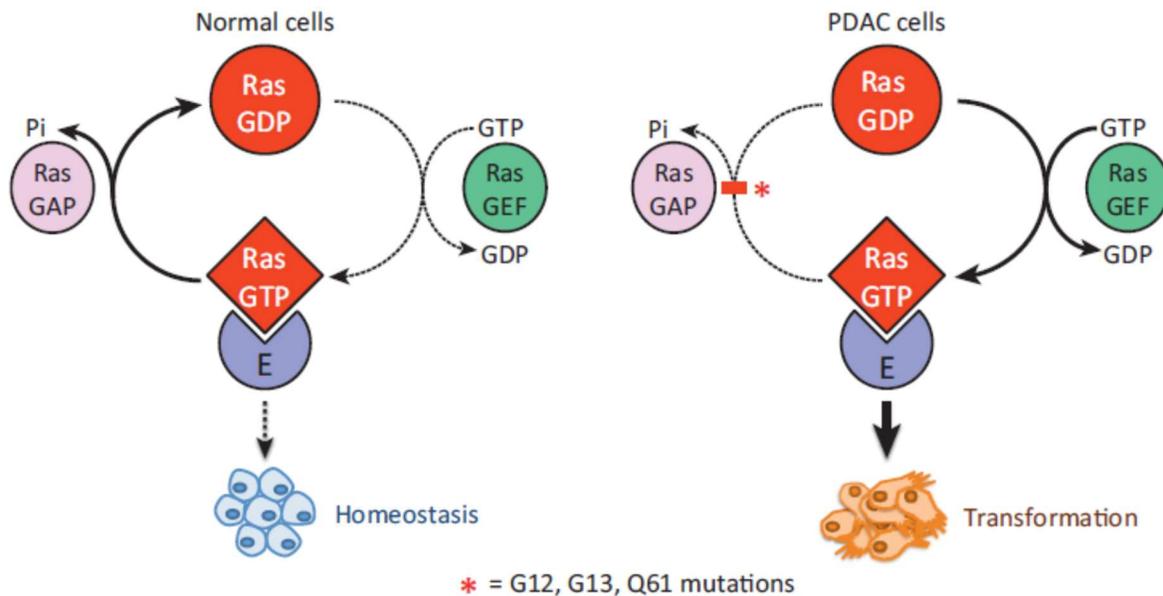


Fig. 1.2.1. Mecanismo GDP-GTP en células normales y con diagnóstico adenocarcinoma ductal pancreático.^[30, 37]

G12 continúa siendo la mutación con mayor frecuencia (98%), G13 y Q61 se logran encontrar con menores frecuencias. Se han identificado ocho distintas sustituciones de aminoácidos en G12, siendo G12D (Glicina reemplazada por Ácido aspártico) la predominante. Es importante mencionar que esta mutación confiere peor pronóstico así como disminución en sobrevida de quienes la presentan.^[37, 39, 40]

2. Justificación.

Las mutaciones en el gene *KRAS* se encuentran en el 90-95% de todos los adenocarcinomas pancreáticos de poblaciones caucásicas. En Latinoamérica se desconoce la frecuencia y el tipo de mutaciones en el mismo, por lo que es indispensable estudiarlo en nuestra población. El conocimiento de estas mutaciones nos ayudará a comprender mejor la enfermedad en general y en particular saber si podrían existir factores de riesgo diferentes en México así como tener un probable marcador para la detección oportuna de esta patología.

3. Hipótesis.

Los pacientes mexicanos con adenocarcinoma ductal de páncreas presentarán una frecuencia menor de mutaciones en el gene *KRAS* que en otras poblaciones.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

- Identificar las variantes/mutaciones del gene *KRAS* causantes de adenocarcinomas pancreáticos en pacientes mexicanos.

4.2. Objetivos específicos.

- Determinar la frecuencia de mutaciones de *KRAS* en adenocarcinomas pancreáticos en población mexicana.
- Correlacionar las mutaciones con el fenotipo de la cohorte estudiada.

5. Metodología.

5.1. Selección de muestras.

Las muestras de tejido pancreático se obtuvieron del "Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán", de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas. Pertenecen al departamento de patología por lo que muchos pacientes ya no se encontraban con vida al momento de tenerlas y analizarlas. A dichas muestras de tejido fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE) se les realizó extracción de ADN y se mantuvieron (junto con las muestras de parafina) a -70°C en tubos de microcentrifuga Eppendorf® de 1.5ml. Del total de muestras, 31 son adenocarcinoma ductal de páncreas, 3 adenocarcinoma de células acinares, 2 adenocarcinoma y una adenocarcinoma sin observarse tejido pancreático; el estudio se realizó finalmente con 22 muestras por material insuficiente de muestra en los bloques de parafina y por cumplir con 2 criterios de exclusión.

5.1.1. Criterios de inclusión.

- Mayores de 21 años.
- Diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas por patología como tumor primario.
- No haber recibido ningún tipo de tratamiento para la neoplasia.
- No haber tenido algún diagnóstico previo de cualquier tipo de cáncer.
- Resección suficiente y en buenas condiciones de tejido pancreático con adenocarcinoma.

5.1.2. Criterios de exclusión.

- Mala calidad y baja cantidad de ADN obtenido (Relación 260/230).
- Celularidad tumoral de la biopsia < 40%.

5.2. Análisis de fusión de alta resolución (High Resolution Melting; HRM).

Es un análisis post-PCR (Reacción de la polimerasa en cadena por sus siglas en inglés; polymerase chain reaction) tiempo real en el que se comparan curvas de disociación de las cadenas de ADN. Se dio a conocer en 1997^[38] y desde ese entonces se han mejorado los reactivos para hacer de este análisis una herramienta de laboratorio más eficaz. Una ventaja que posee es el utilizar el amplicón directamente para pruebas distintas (por ejemplo, secuenciación Sanger).

Fundamento de la técnica.

Después de la amplificación mediante PCR tiempo real, este método sigue por sistemas ópticos y en intervalos de 2s (aproximadamente) la pérdida en la fluorescencia por la liberación de un colorante saturante unido a dúplex de ADN, el cual es denaturado al aumentar la temperatura, lo que genera curvas de fusión características de temperatura VS fluorescencia.

Tras realizar esto, el software de análisis define la temperatura de fusión (melting temperature; T_m) de un producto de PCR como el punto de inflexión de la curva de fusión mediante cálculos logarítmicos con el fin de visualizarla más claramente. Es una medida útil para visualizar la pureza del producto de PCR debido a que los dímeros de cebadores y otros productos de PCR no específicos pueden verse en los datos en crudo que se obtienen en un inicio.

Es un método en tubo que brinda una ventaja mayor ya que el análisis se realiza inmediatamente después de la amplificación lo que evita el cruce de productos de PCR. Tiene un gran potencial para la detección rápida y barata en las variaciones de la secuencia de ADN.

Procedimiento para genotipificación mediante HRM.

La técnica requiere controles para basarse en ellos y así poder genotipificar las muestras; dichos controles fueron líneas celulares con mutaciones homocigotas "wild-type" y heterocigotas en el gene *KRAS*.

- Cultivo celular.

Se utilizaron tres tipos distintos de líneas celulares de acuerdo a la mutación que presentan: BxPC3 (wild-type), CFPAC-I (heterocigoto) y CRL-5895 (homocigoto).

- **BXPC3.**

Organismo: Homo sapiens.

Tejido: Pancreático.

Enfermedad: Adenocarcinoma.

Edad: 61 años.

Género: Femenino.

Tipo celular: Epitelial.

Propiedades de crecimiento: Adherencia.

Crecimiento en medio RPMI-1640 modificado para contener 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 1mM piruvato de sodio, 4500 mg/L glucosa, y 1500 mg/L bicarbonato de sodio.

- **CFPAC-I.**

Organismo: Homo sapiens.

Tejido: Pancreático; proveniente de metástasis de hígado.

Enfermedad: Adenocarcinoma ductal de páncreas, fibrosis quística.

Edad: 26 años.

Género: Masculino.

Tipo celular: Epitelial.

Propiedades de crecimiento: Adherencia.

Crecimiento en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) que contiene 4 mM L-glutamina, 4500 mg/L glucosa, and 1500 mg/L bicarbonato de sodio.

- **CRL-5895.**

Organismo: Homo sapiens.

Tejido: Pulmonar; proveniente de metástasis de pleura.

Enfermedad: Adenocarcinoma grado IV.

Edad: 50 años.

Género: Masculino.

Tipo celular: Epitelial.

Propiedades de crecimiento: Adherencia.

Para su crecimiento utiliza medio RPMI-1640 modificado para contener 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 4500 mg/L glucosa, y 1500 mg/L bicarbonato de sodio.

Los medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

5.2.1 Extracción de ADN.

Se realizó extracción de ADN mediante QIAamp DNA Mini Kit (250) de la marca Qiagen® de las líneas celulares al tener una confluencia celular 60-80% en cajas de Petri de 90mm de diámetro, éstas se ocuparon para curva estándar.

5.2.2. Cuantificación y calidad del ADN.

Tras extracción del ADN, se realizó cuantificación de las muestras mediante espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific™ NanoDrop® ND-1000. Obteniendo lecturas medias de 260/280=2.15 y 260/230=1.8.

Tras extracción de ADN genómico en esas líneas celulares, se realizó el experimento con HRM para generar la curva estándar que nos identificaría las muestras.

5.2.3. Selección de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:
5'**TGAAAACGACGGCCAGTT**TATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'
5'**CAGGAAACAGCTATGACCT**GAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACT-3'.
Las letras negritas refieren las secuencias M13.

Análisis de fusión de alta resolución (High Resolution Melting; HRM).

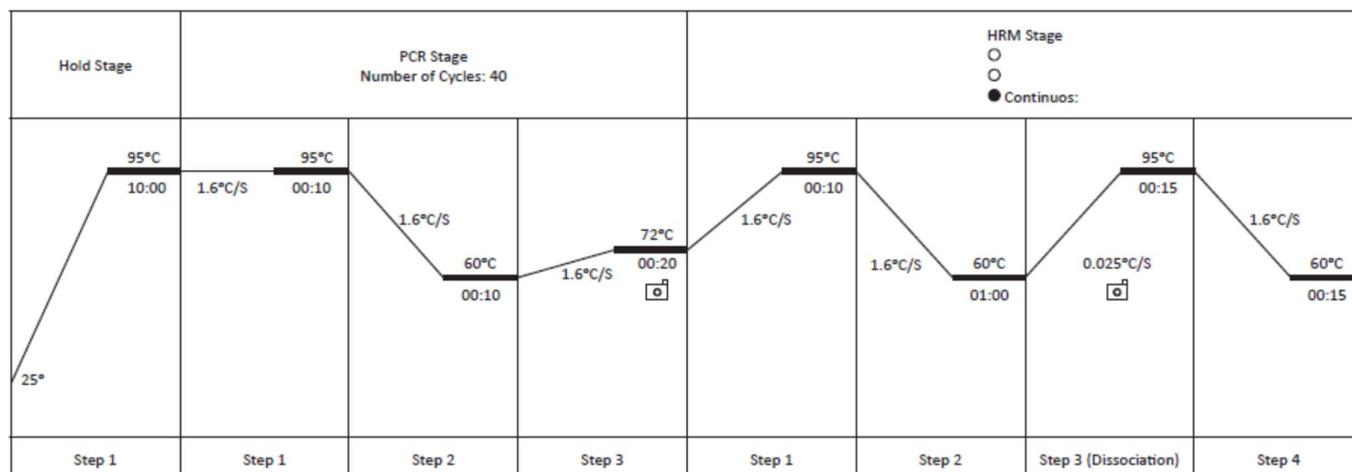
Para realizar el estudio de HRM, se cuenta con el siguiente equipo:

- Se utiliza QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System de Applied Biosystems™.
- Así como el programa para PC QuantStudio™ Software V1.3—for QuantStudio™ 6 and 7 Flex and ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems de Applied Biosystems™.
- Placas de 384 pozos: MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode de Applied Biosystems™.
- Film adhesivo: MicroAmp® Optical Adhesive Film de Applied Biosystems™.
- Reactivo MeltDoctor™ HRM Master Mix de Applied Biosystems™.

Cada pozo de la placa está constituido por:

Melt Doctor Master Mix	10µl
Primer Forward	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl
Agua bidestilada	Aquí depende la concentración del ADN (deben ser 20ng/µL) ya que el total de agua y ADN deben ser 20µl.
ADNg	

Las indicaciones de análisis para PCR y HRM son:



6. Resultados.

En primer lugar estandarizamos la técnica de “derretimiento” (melting) de alta resolución HRM, utilizando un equipo QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System. Como se describió en Material y Métodos, esta técnica está basada en la pequeña diferencia que se presenta en el momento del derretimiento entre secuencias que se complementan perfectamente (por ejemplo AA:TT o GG:CC) sobre las que no se complementan (por ejemplo AT:TT o GC:CC). Es por ello que los productos de PCR generados se someten a calentamiento hasta lograr la separación de las hebras utilizando intervalos muy pequeños de temperatura. Es importante utilizar asimismo controles de específicos para lograr una comparación directa.

Para iniciar con este punto, utilizamos oligonucleótidos que amplifican una región pequeña del gene *KRAS* en la que se encuentran la gran mayoría de las mutaciones reportadas en el cáncer de páncreas

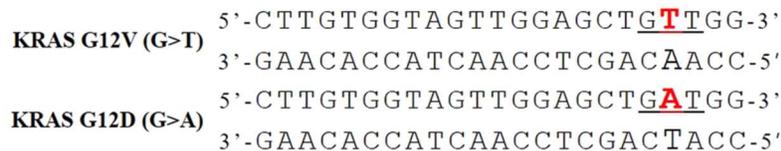


Fig. 6.1. Localización de *KRAS* oncogénico, sustitución de un solo nucleótido (c.35 G > T and c.35 G > A) resultando en sustituciones G12V y G12D.

El fragmento amplificado es de 189 pares de bases y cubre las mutaciones que dan lugar a la alteraciones denominadas *KRAS* G12V, G12D, G12R, G12C y G12A, en las que se sustituyen aminoácidos específicos en la posición 12 de la proteína.

Una gráfica de derretimiento adecuada muestra implica convertir los datos crudos a una gráfica análisis diferencial, que permite, mediante una transformación en la que los valores se sustraen de la referencia (típicamente un control silvestre), obtener las diferencias de una manera que se visualizan mucho mejor y permiten distinguir las variantes.

Como se muestra en la Figura 5.1, nuestro primer experimento mostró una adecuada curva de amplificación. Sin embargo, los controles no fueron debidamente asignados por el algoritmo y una

de las líneas celulares estaba repetida como "homocigota" para la mutación por lo que al momento de genotipificar, las gráficas eran semejantes.

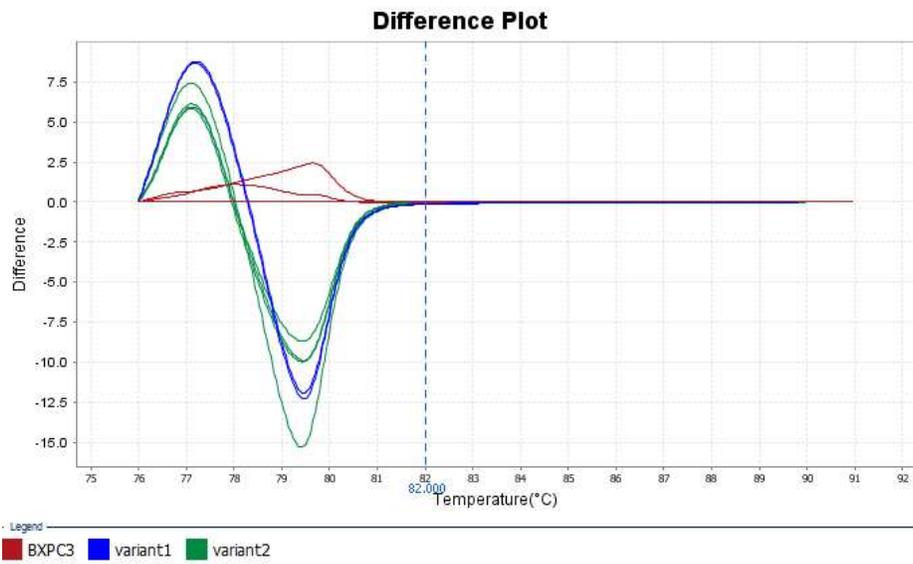


Fig. 6.2. Experimento 1. Gráfica representativa de HRM, muestra al wild-type (rojo) y dos líneas celulares (variant 1 y 2) como heterocigotas para la mutación.

Con el fin de avanzar en la estandarización, utilizamos dos líneas celulares con un estatus homo y heterocigoto en KRAS. Estas fueron la línea CFPAC, que presenta una mutación heterocigota G>T y la línea CRL5895 con una mutación homocigota G>C

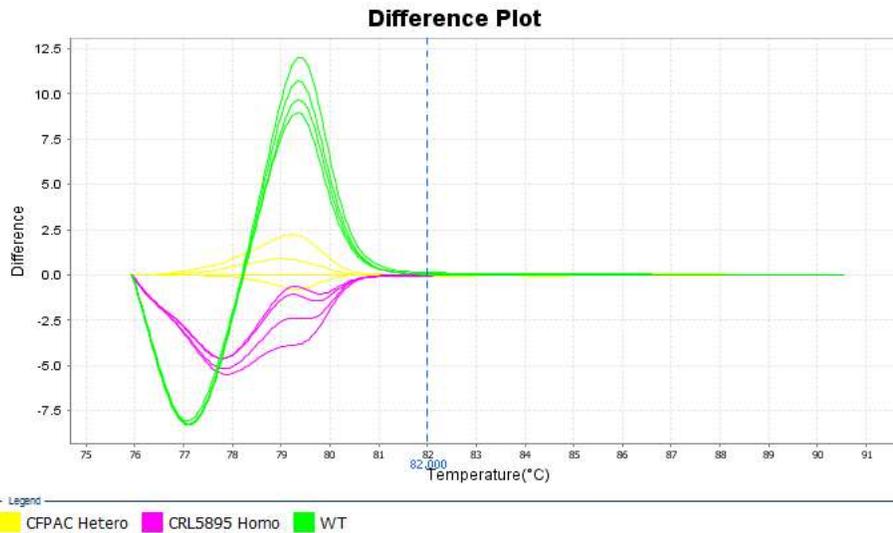


Fig. 6.3. Diferencia en curvas de HRM para cada tipo celular. Estandarización.

Como se muestra en la Figura 5.2, en esta ocasión la amplificación y derretimiento fueron exitosos, obteniendo curvas características de HRM, en donde es posible distinguir claramente los amplicones con KRAS con mutaciones heterocigotas y homocigotas, además del control silvestre. En concordancia con los resultados visuales, el algoritmo propietario del equipo de HRM nos mostró que las muestras fueron genotipificadas adecuadamente (Fig. 5.3).

Sample Na...	Target Na...	Task	Dyes	Variant Call
WT	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-WT
WT	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
WT	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
WT	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
CRL5895 Homo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CRL5895 Homo
CRL5895 Homo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
CRL5895 Homo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
CRL5895 Homo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
CFPAC Hetero	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CFPAC Hetero
CFPAC Hetero	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Hetero
CFPAC Hetero	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Hetero
CFPAC Hetero	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Hetero
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	

Fig. 6.4. Curva estándar, genotipificación.

El cáncer es una enfermedad genómica de alta complejidad, en la que coexisten diversas clonas celulares, productos de una “microevolución” mediante la cual las células poseen ventajas selectivas y suelen dominar a la población celular, por lo menos hasta que una nueva clona surja. Estas clonas suelen tener un patrón de mutaciones diferente, dado a que uno de los principales mecanismos de progresión del cáncer son las mutaciones de novo que se producen durante el proceso. Esto, aunado a la presencia de otros tipos celulares propios del estroma tumoral, como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, etc., hacen que una mutación específica no se encuentre en el 100% de las células. En el caso particular del cáncer de páncreas, esta situación es aún peor, dado a que se conoce que este tipo de tumores presenta una reacción “desmoplástica” con una gran cantidad de estroma. Es por ello que, tras obtener una genotipificación adecuada, decidimos realizar un tercer experimento simulando lo que sucede en una muestra de tejido tumoral donde no solo existen células tumorales, también células proinflamatorias e incluso tejido sano.

Para este fin mezclamos 25% de ADN de ambas líneas celulares que presentan la mutación con 75% de la línea con *KRAS* silvestre.

Desafortunadamente, el resultado mostró curvas diferentes a las obtenidas en la estandarización ya que algunas muestras no fueron genotipificadas correctamente (Fig. 5.4 y Fig. 5.5). En las muestras en donde se realizó la mezcla se obtuvo una genotipificación en la cual solo correspondían 2 de los 3 triplicados de cada línea celular (es importante mencionar que cada muestra se corre por triplicado con el fin de tener un análisis más robusto). Esto podría deberse a varias causas, entre ellas el equipo o problemas de pipeteo.

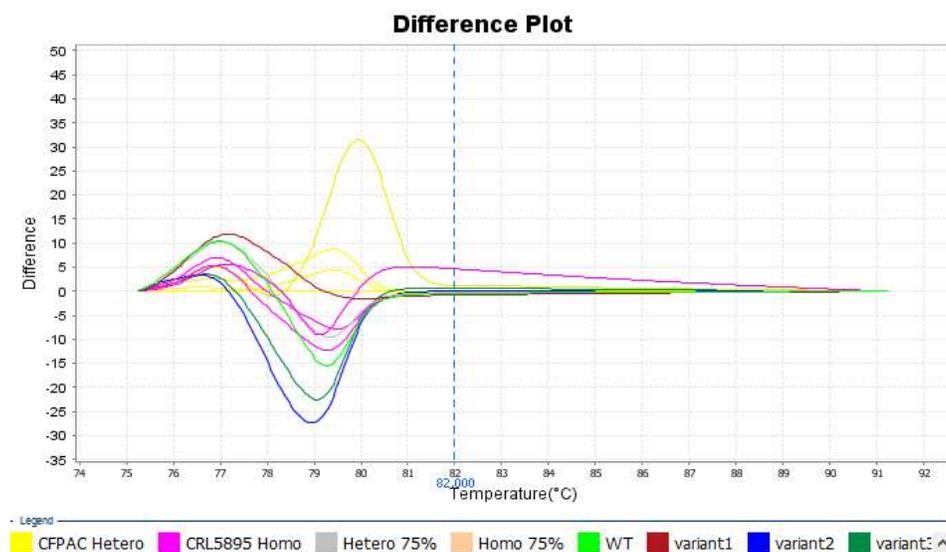


Fig. 6.5. Curva estándar del experimento No.3. Se observan muestras no genotipificadas.

Sample Na...	Target Na...	Task	Dyes	Variant Call
Hetero 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-Hetero 75%
Hetero 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Hetero 75%
Hetero 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Hetero 75%
Hetero 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
Homo 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-Homo 75%
Homo 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
Homo 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant2
Homo 75%	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	

Fig. 6.6. Resultados experimento No. 3. Se muestra una genotipificación no concordante con muestras.

Con el fin de verificar si alguna de estas razones era la causante de la falta de reproducibilidad, realizamos una nueva estandarización para "FAST PCR" en placas de 96 pozos.

En los próximos experimentos (5to, 6to y 7mo) se utilizó esta versión de PCR así como las placas mencionadas pero ninguno de estos experimentos mostraron resultados satisfactorios y en ninguno de ellos se pudo establecer el genotipo correcto de las líneas celulares. En el caso del experimento No. 5 que se realizó para corroborar la estandarización, no se obtuvo una genotipificación adecuada ya que se obtenían muestras de la curva como variantes (semejante a los resultados del experimento No. 4).

En el sexto experimento se realizó curva estándar junto con 3 muestras de pacientes (de las que ya se conocía el tipo de mutación) para saber cómo se comportaría la curva con las muestras. Se obtuvo una genotipificación adecuada solo en una de las muestras de pacientes, sin embargo, la curva estándar seguía siendo un problema y aún con cambios en temperatura no resultaba adecuada. En el caso del séptimo experimento incluía solamente la curva estándar, no pudo genotipificarse e incluso algunos pozos no poseían amplificación.

Tras varios meses de ensayo y error, decidimos continuar con el análisis HRM post-PCR placa de 384 pozos. Se corrió una placa para verificar nuestra curva estándar, misma que no resultó adecuada ya que en dos pozos de dos líneas celulares mostraron cambios en la genotipificación. Posteriormente, el experimento No. 9 fue realizado con dos placas, la primera con la curva estándar solamente y la segunda contenía también muestras de líneas celulares colocadas al azar con el fin de simular una genotipificación adecuada que no fuese influenciada por la localización cercana a ciertas líneas celulares y/o sus controles.

Sample Na...	Target Na...	Task	Dyes	Variant Call
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-WT
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CFPAC Hetero
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant1
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 Homo
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Hetero
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CRL5895 Homo
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant1
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant2
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant2
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	

Fig. 6.7. Ejemplo de genotificación no concordante con muestra.

Los resultados fueron excelentes, en ambas placas la curva estándar fue adecuada y en el caso de las muestras solo existió un pequeño error en las correspondientes a línea wild-type.

BXPC3W	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	variant1
BXPC3W	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
BXPC3W	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
CM1Htro	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
CM1Htro	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
CM1Htro	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
CRHmo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
CRHmo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
CRHmo	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	

Fig. 6.8. Experimento 9. Genotificación adecuada de curva estándar (izquierda). Genotificación de líneas celulares como muestras (derecha).

Los experimentos 12 y 13 se corrieron en fechas distintas, sin embargo, ambos con resultados semejantes a los que presentó el experimento 11 así como amplificación en controles negativos.

Sample Na...	Target Na...	Task	Dyes	Variant ...
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-WT
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
MuestraW	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	WT
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CF...
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
MuestraHt	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CFPAC Het...
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	
	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	Control-CR...
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
MuestraHm	HRM	UNKNOWN	MELTDOCTO...	CRL5895 H...
	HRM	NTC	MELTDOCTO...	

Fig. 6.9. Experimento 13. Se muestran cambios en líneas celulares, CRL5895 no corresponde con control WT (Wild-Type).

Debido a la falta de reproducibilidad, decidimos cambiar de estrategia y utilizar secuenciación Sanger, que, aunque menos sensible, sigue siendo el estándar de oro utilizado para detectar mutaciones puntuales en diversos tumores. Para este fin de manera inicial utilizamos las líneas celulares previamente usadas en los ensayos de HRM. Utilizamos oligonucleótidos con la misma secuencia que la utilizada en el caso de los ensayos de HRM. Después de amplificados se realizó la secuenciación capilar utilizando la plataforma de Illumina. Los electroferogramas fueron analizados usando el programa 4 peaks que nos permite realizar el “llamado” de bases a partir de los electroferogramas. Como se muestra en las Figuras 6.10, 6.11 y 6.12 la secuenciación mostró los picos esperados y el llamado de las bases coincide con lo reportado para estas líneas celulares.

- Estos son algunos de los electroferogramas resultantes.

Muestras sin mutación para el gene *KRAS* (WT).

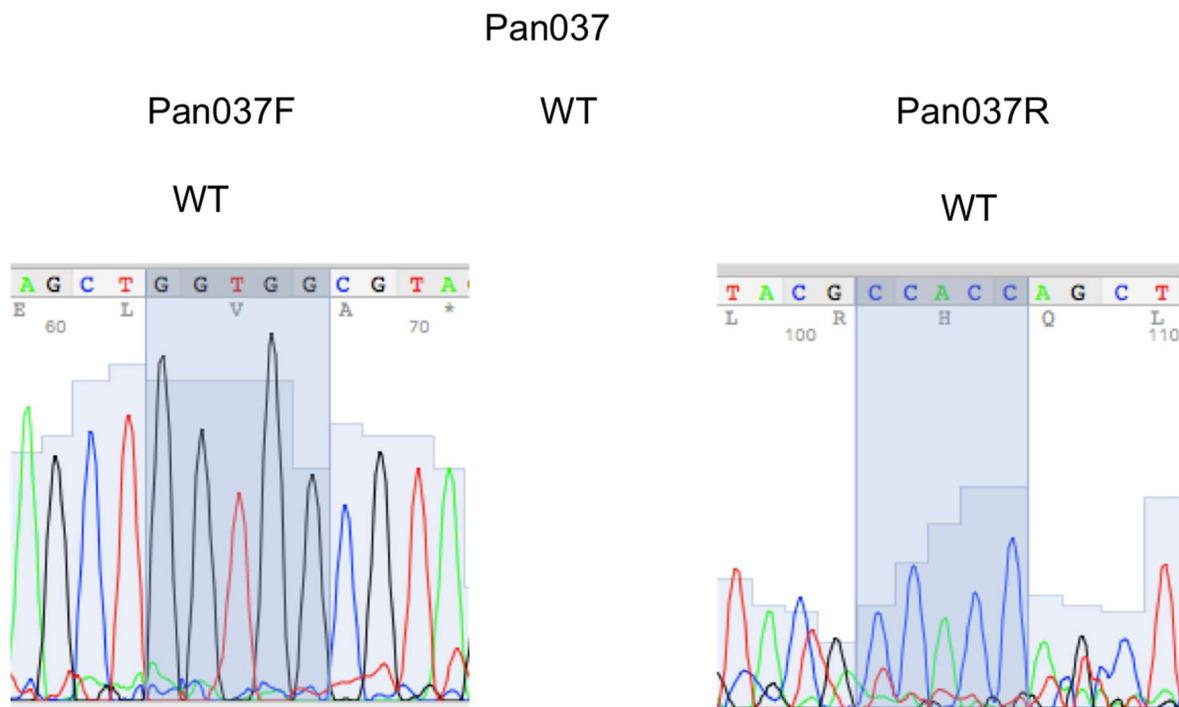


Fig. 6.10. Electroferogramas de secuenciación por Sanger. Hebra directa (*forward*, imagen izquierda) y hebra inversa (*reverse*, imagen derecha) de la muestra Pan037; no se observa mutación al ser Wild type.

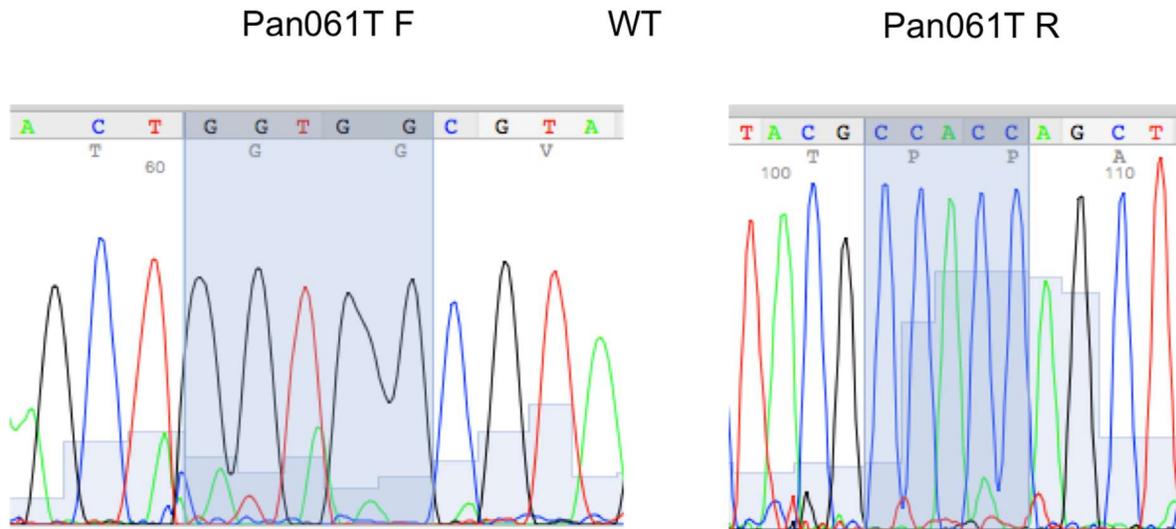


Fig. 6.11. Electroferogramas de secuenciación por Sanger. Hebra directa (*forward*, imagen izquierda) y hebra inversa (*reverse*, imagen derecha) de la muestra Pan061; no se observa mutación al ser Wild type.

Muestras con mutación para el gene KRAS.

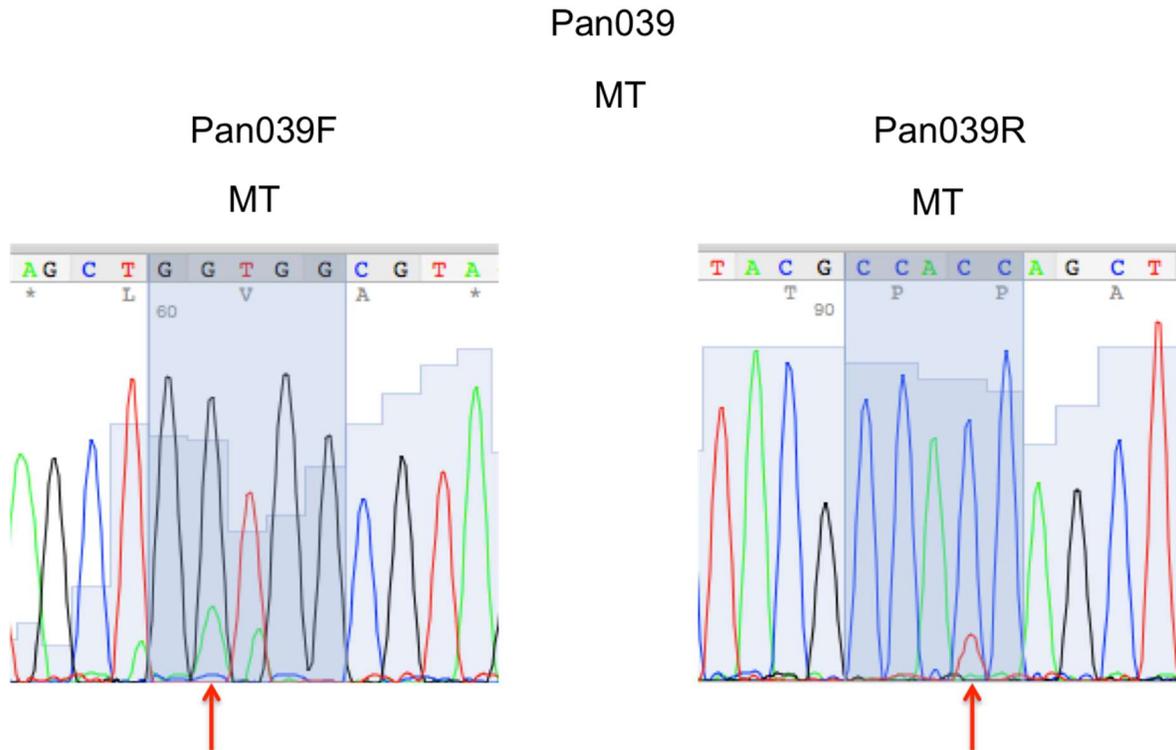


Fig. 6.12. Electroferogramas de secuenciación por Sanger. Hebra directa (*forward*, imagen izquierda) y hebra inversa (*reverse*, imagen derecha) de la muestra Pan039; las flechas muestran cambio de G/A.

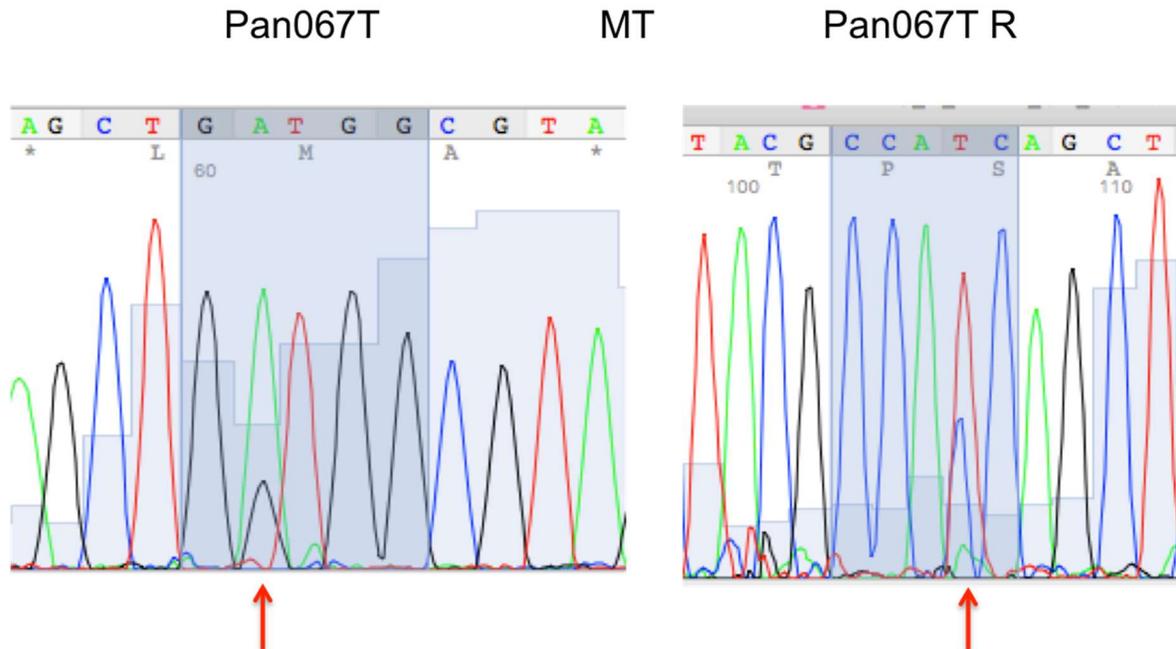


Fig. 7.3. Electroferogramas de secuenciación por Sanger. Hebra directa (*forward*, imagen izquierda) y hebra inversa (*reverse*, imagen derecha) de la muestra Pan067; las flechas muestran cambio de G/A.

Posterior al análisis de la secuenciación e incluso repitiendo el estudio en muestras con baja calidad o donde existía duda de la presencia de mutación, se obtuvieron las siguientes frecuencias (Tabla 7).

Tabla 7. Mutaciones de *KRAS* obtenidas en 22 muestras de pacientes mexicanos con diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas. Método Secuenciación Sanger.

Muestra (n=22)	Secuencia	Tipo de mutación
Pan001	GGTGG	WT
Pan003	GGTGG	WT
Pan022	GGTGG	WT
Pan030	GGTGG	WT
Pan036	GGTGG	WT
Pan037	GGTGG	WT
Pan038	GTTGG	G12V
Pan039	GATGG	G12D
Pan040	GATGG	G12D
Pan041	GGTGG	WT
Pan042	GGTGG	WT
Pan056	GGTGG	WT
Pan058	GTTGG	G12V
Pan061	GGTGG	WT
Pan062	GGTGG	WT
Pan063	GTTGG	G12V
Pan065	GTTGG	G12V
Pan066	GTTGG	G12V
Pan067	GATGG	G12D
Pan068	GGTGG	WT
Pan069	GTTGG	G12V
Pan070	GTTGG	G12V

De manera muy interesante, encontramos que 12 (54.5%) de las 22 muestras tenían el fenotipo silvestre de *KRAS*, mientras que 10 (45.6%) el fenotipo mutado. De este último la mayoría tuvieron la mutación G12V (7 muestras/31.8%) y el resto G12D (3 muestras/13.6%) (Tabla 7.1)

Tabla 7.1. Frecuencias de mutaciones de *KRAS* de 22 muestras de pacientes mexicanos con diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas. Método Secuenciación Sanger.

Secuencia	Mutación	Frecuencia (%)
GGTGG	Wild Type (WT)	12 (54.5)
GATGG	G12D	3 (13.6)
GTTGG	G12V	7 (31.8)

7. Discusión.

Se ha estudiado el gene *KRAS* en muchas poblaciones, sin embargo no en países latinoamericanos. En población caucásica existe una frecuencia de mutación de este gene hasta del 95%; en 2015 un estudio realizado en Pennsylvania reveló una frecuencia de mutación del 92% de los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas.^[30, 39] En otras poblaciones se han encontrado frecuencias menores de este gene para esta patología como es el caso de la población francesa que presenta una frecuencia de 67%^[40]. La población coreana es quien presenta la menor frecuencia de presentación de este gene con un 47.2%^[41] y es en ese mismo estudio donde reportan frecuencias de otras poblaciones, llegando a la conclusión de que la población asiática (en general) presenta una baja frecuencia.

Hasta ahora, la única mutación en *KRAS* asociada a un peor pronóstico es G12D; los pacientes presentan menor respuesta a tratamiento (quimioterapia) así como disminución en la sobrevida.^[40]

El resto de las mutaciones no juegan un papel importante en el estadio de la enfermedad, así como tratamiento ni pronóstico. Sin embargo, todas las mutaciones en este residuo se consideran como la alteración más importante en la génesis tumoral, por su frecuencia.

En el torrente sanguíneo, las células con mutación en *KRAS* se destruyen en menos de 24h con una efectividad del 99%, sin embargo, esta mutación particular se asocia con inmunosupresión localizada en el tumor. Es más, existen modelos matemáticos donde se demuestra que para crear un ambiente idóneo en el tumor y proceder a una metástasis, el gene conductor no necesariamente debe ser *KRAS* pero es fundamental se encuentre mutado para continuar con el proceso de carcinogénesis mencionado en esta tesis; es decir; en el modelo de progresión genética del adenocarcinoma ductal de páncreas no es necesaria la vía mencionada pero los genes asociados deben estar presentes y *KRAS* continua siendo indispensable para la progresión y metástasis.^[40]

La heterogeneidad tumoral, es decir las diferentes variedades tumorales en cada paciente dificulta el tratamiento de esta patología. Esto es debido a que la progresión de la enfermedad está determinada por los genes conductores específicos, como se ha demostrado para la alteración de *KRAS* específica G12D. Esto mismo puede suceder con la existencia de mutaciones en otros genes relevantes que pueden dar resistencia o hacer un tumor más agresivo. Esta es una de las razones más importantes para continuar con estudios en amerindios, no se cuenta con información relacionada al genotipo/fenotipo de esta etnia y se sabe que dependiendo el gene conductor se puede iniciar tratamiento con quimioterapéuticos específicos o quirúrgico. Desafortunadamente, hasta el momento los estudios solo se basan en un solo gene conductor.^[39, 40]

En el presente proyecto pretendimos realizar el análisis de mutaciones de *KRAS* mediante una técnica novedosa (HRM) que permite, utilizando la diferencia de “derretimiento” (melting) del

ADN entre hebras complementarias perfectas versus hebras complementarias con bases no hibridadas o diferente composición de bases. Se ha reportado que esta técnica es más sensible que la secuenciación directa por Sanger, dada la capacidad de los nuevos equipos de fluorescencia para detectar cambios muy pequeños causados por diferencias menores de 1 grado en temperatura. Sin embargo, aunque pudimos estandarizar la técnica, notamos que, por lo menos en nuestras manos, no es reproducible. Bajo condiciones estándar, es decir, usando ADN en el cual la mutación se encuentra en el 100% de las hebras de ADN (o por lo menos en 50% de las mismas en el caso de muestras con heterocigocidad), la técnica demuestra una gran reproducibilidad. Sin embargo, cuando se diluye el ADN comenzamos a tener muestras que no se comportan como se esperaba. Las razones de este comportamiento pueden ser varias, como problemas en la homogeneidad de la placa de calentamiento, problemas en el software, baja calidad de ADN o problemas en el pipeteo. Dado a que el equipo realiza rutinariamente cuantificación de expresión sin problemas, y las muestras con hetero u homocigocidad perfecta no presentan problema, asumimos que nuestra dificultad podría deberse a la baja calidad del ADN, problemas en el pipeteo o ambas. Aunque no se excluye, los problemas en el pipeteo no se observaron en el caso de las muestras de líneas celulares, lo que señalaría que el principal problema sería la calidad del ADN. Dado a que este ADN fue extraído de muestras de parafina, la calidad de ADN no es la mejor y no es posible mejorarla. Este material de archivo no fue procesado pensando en la recuperación de ácidos nucleicos posteriores, por lo que muchas veces no es posible amplificar ADN adecuadamente. Esto, sumado a posibles inexactitudes en el pipeteo podría ser la causa de la falta de reproducibilidad de la técnica en nuestras manos. Una solución para este problema sería realizar el estudio en muestras en fresco o, por lo menos, en muestras de muy reciente inclusión, con el fin de mejorar la calidad de ADN.

Con el fin de avanzar en la comprobación de nuestra hipótesis, decidimos por ende realizar secuenciación capilar (Sanger) utilizando oligonucleótidos similares a los utilizados en el caso de la técnica de HRM. En este caso fue posible realizar la técnica en 22 muestras. Con el fin de tener una doble validación, realizamos la secuenciación en ambos extremos (derecha o 5' e izquierda o 3'). De manera muy interesante, encontramos que 12 (54.5%) de las 22 muestras tenían el fenotipo silvestre de *KRAS*, mientras que 10 (45.6%) el fenotipo mutado. De este último la mayoría tuvieron la mutación G12V (7 muestras/31.8%) y el resto G12D (3 muestras/13.6%). Es importante destacar que la frecuencia de mutaciones de *KRAS* en pacientes mexicanos, de acuerdo a nuestro estudio es de 45.5%, menor que la población coreana y mucho menor que la reportada en poblaciones caucásicas, en las que por lo general se encuentra por arriba del 90%.

De manera interesante también encontramos diferencias en el tipo de mutación encontrada. Como mencioné, la mutación G12V fue más frecuente (7 muestras/31.8%) y el resto G12D (3 muestras/13.6%). Esto difiere del porcentaje reportado en la literatura, siendo la mutación G12D la más frecuente (35%), seguida por G12V (24%) (datos derivados de Cosmic <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). La razón de esto podría estar relacionada con las causas de las diferencias en las frecuencias globales de *KRAS* en la población mexicana.

No conocemos las posibles razones que determinan las diferencias en las alteraciones halladas. Sin embargo, podemos hipotetizar que existen dos posibilidades. La primera es la probable existencia de diferencias en los factores de riesgo para esta neoplasia en nuestro país. No existen prácticamente estudios en población latinoamericana que hayan estudiado factores de riesgo ambientales para esta neoplasia, por lo que no conocemos diferencias en las mismas. No existe reportes de mayor prevalencia de alcoholismo, por ejemplo, en población mexicana. Uno de los factores podría ser la obesidad, aunque las diferencias poblacionales difícilmente explicarían los datos, dado a que la prevalencia de obesidad en los Estados Unidos no difiere significativamente de la mexicana. Finalmente, cabe todavía la posibilidad de la existencia de factores aún desconocidos no puede ser excluida. La segunda posibilidad es la genética. Dado a que se conocen diferencias en la prevalencia de variantes genómicas que inciden en la prevalencia de factores de riesgo, esta podría ser una posible explicación para las diferencias. Por ejemplo, se conoce que hay una mayor prevalencia de hipertrigliceridemia en población mestiza^[42] causada por varios polimorfismos de un solo nucleótido como el caso de los genes *APOA5*, *ANGPTL4* y *TIMD4*. Será necesario realizar estudios más amplios para poder elucidar las razones para estas diferencias.

Estos resultados resaltan la importancia de estudiar las diferencias genotípicas poblacionales, con la finalidad de descubrir algún factor genético o ambiental que esté provocando esto. De esta forma, se podrían desarrollar herramientas para un diagnóstico temprano, un tratamiento dirigido y personalizado así como un pronóstico más favorable para el adenocarcinoma pancreático.

Desafortunadamente, en nuestro país no se cuenta con una amplia investigación en esta patología, de hecho, los datos que se presentan en el rubro de epidemiología son obtenidos de diversas fuentes como GLOBOCAN, más recientes que INEGI. Al no ser una patología con alta incidencia, a diferencia del cáncer de mama, es difícil obtener información nacional.

El presente estudio es un inicio para continuar investigaciones relacionadas a esta patología, siendo uno de los primeros en dirigirse a genes relacionados a la misma y aún con problemas en la metodología, una población de estudio pequeña, podemos hacer un estimado de la frecuencia en la misma, es importante la asociación genotipo/ fenotipo de nuestra población, en especial por el índice de fatalidad tan elevado que presenta y al no existir mayor información en nuestra población de estudio.

8. Conclusiones.

- La frecuencia de mutación del gene *KRAS* para población mexicana es menor comparada con otras poblaciones, en particular la caucásica, alrededor del 92% al 45.4%.
- En nuestras manos, la técnica de HRM resultó poco reproducible, siendo la secuenciación Sanger una mejor opción.
- Es indispensable ampliar el grupo de estudio para validar los datos con el fin de fortalecer la frecuencia encontrada en este trabajo.

III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Ocampo, C., Zandalazini, H. Anatomía quirúrgica del páncreas. Cirugía digestiva. 2009;IV-468:1-6.
2. Moore, K. L., Dalley, A. F., Moore. Anatomía con orientación clínica, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
3. Pró, E. A., Anatomía Clínica, Ed. Médica Panamericana, 1a ed., Buenos Aires, 2012.
4. Raichholz, G., Giménez, S. et al. Anatomía segmentaria del páncreas y variantes del desarrollo. Revista Argentina de Diagnóstico por Imágenes. 2016;5(13):43-52.
5. Sadler, T. W. Embriología médica, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 13a ed., Philadelphia, 2016.
6. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., Embriología Clínica, Ed. Elsevier Saunders, 9a ed., Barcelona, España, 2013.
7. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PAX4>
8. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PAX6&keywords=pax,6>
9. Genesser, F. et. al. Geneser Histología, Ed. Médica Panamericana, 4a ed., México, D.F., 2014.
10. Hall, J. E., Guyton A. C., Tratado de fisiología médica, Ed. Elsevier Saunders, 12a ed., Barcelona, España, 2011.
11. Suckale, J., Solimena, M., Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the β -cell. Frontiers in Bioscience. 2008;13:7156-7171.
12. Heller, R. S., Jenny, M. et al. Genetic determinants of pancreatic α -cell development. Developmental Biology. 2005;286:217-224.
13. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=657864>
14. Ferlay J., Soerjomataram I. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
15. M. Lowy, A. et al. Pancreatic Cancer, Ed. Springer, 1era ed., Nueva York, 2008.
16. Kamisawa, T. et al. Pancreatic cancer. The Lancet. 2016;388:73-85.
17. Decker, G. A. et al. Risk Factors for Pancreatic Adenocarcinoma and Prospects for Screening. Gastroenterology & Hepatology. 2010;6(4):246-254.
18. Braganza, J. M., Lee, S. H. et al. Chronic pancreatitis. The Lancet. 2011;377:1184-1197.

19. Brock, C., Møller, L. et al. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(42):7231-7240.
20. Davies, J. C., Alton, E. W. F. W. et al. Cystic fibrosis. *British Medical Journal*. 2007;335:1255-1259.
21. Cutting, G. R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(1):45-56.
22. Su, G. et al. Germline and Somatic Mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers Gene in Pancreatic and Biliary Cancers. *American Journal of Pathology*. 1999;154(6):1835-1840.
23. Hee, S. et al. Gastrointestinal Cancers in a Peutz-Jeghers Syndrome Family: A Case Report. *Clinical Endoscopy*. 2013;46:572-575.
24. Chang, M. C. et al. Screening and early detection of pancreatic cancer in high risk population. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(9): 2358-2364.
25. Riegert-Johnson, D. et al. Case studies in the diagnosis and management of Peutz-Jeghers syndrome. *Familial Cancer*. 2011;10:463-468.
26. Kopacova, M. et al. Peutz-Jeghers syndrome: Diagnostic and therapeutic approach. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(43):5397-5408.
27. Makohon-Moore, A. et al. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. 2016;16:553-565.
28. Bardeesy, N. et al. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:897-909.
29. Lacobuzio-Donahue, C. A. et al. Genetic Basis of Pancreas Cancer Development and Progression: Insights from Whole-Exome and Whole-Genome Sequencing. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(16):4257-4265.
30. Bryant, K. L. et al. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39(2):91-100.
31. Salazar, A. et al. *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, Ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, México, 2013.
32. <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas/estadios>
33. Albertha Health Services. Adenocarcinoma of the pancreas clinical practice guideline (GI 004): March 2009.

- 34.** Krypuy, M., Newnham, G. et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:295.
- 35.** <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS>
- 36.** Prior, I. A. et al. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*. 2012;72(10):2457-2467.
- 37.** Zeitouni, D. et al. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers*. 2016;8(45).
- 38.** Ririe, K. M. et al. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997;245(2):154-160.
- 39.** Witkiewicz, A. K. et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature Communications*. 2015;6(6744).
- 40.** Bournet, B. et al. KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7:e157.
- 41.** Kwon, M. J. et al. Low frequency of KRAS mutation in pancreatic ductal adenocarcinoma in Korean patients and its prognostic value. *Pancreas*. 2015;44(3):484-92.
- 42.** Aguilar, C. et al. Genetic and environmental determinants of the susceptibility of Amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia. *Metabolism*. 2014; 63(7):887–894.