

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

EXPRESION DE LOS GENES BCL-2 Y BAX EN TUMORES COLORRECTALES HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JESUS HERNANDEZ ROMANO

27/01/93

MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2000





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente**            **Prof. Angelina Quintero Ruiz**

**Vocal**                **Prof. Marisol López López**

**Secretario**         **Prof. Rogelio Rodríguez Sotres**

**1er Suplente**            **Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre**

**2do. Suplente**         **Prof. Raquel Ortega Muñoz**

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio 202, edificio B de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México D. F.

**ASESOR:** Dra. Angelina Quintero Ruiz

*Angelina Quintero*

---

**SUSTENTANTE:** Jesús Hernández Romano

*Jesús Hernández Romano*

---

## **DEDICATORIA:**

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personas que de alguna u otra manera influyeron positivamente en las diferentes etapas de mi vida, a aquellas personas cuya amistad es para mí verdaderamente invaluable, y a aquellas personas que contribuyeron, consciente o inconscientemente, a la culminación del mismo.

A mis padres, Augurio y Esther.

A mis hermanos, Ulises, Omar, Marilú y Pablo.

A mis amigos y amigas Héctor Viramontes Vázquez, Vicente García Jaimes, José Rivelino Flores Miranda, Aldo Sánchez Gadea, Juan Carlos Sigala Alanís, Iván Mendoza, Adriana Esparza Lancon, Laura Uribe, Gabriel Navarrete, Juan Alberto Orozco Tepetzi, Jorge Sandín, Paula Rabortnikof, Paulina, Emilio Zúñiga, Laura Alvarez Carrillo, Jesica Avalos, Laura Olguín, Sara Ugalde, Mariana Lomelí, Yolanda Hernández, Alexandro Bonifaz, Rosana Pelayo, Gerardo Basilio, Armando Orozco, Carolina López Suero, Lucía Reza Canela, Lilia Robles, Sara Martínez Trip, Yeng Chi Martínez, Gabriela Meza Parra, Georgina Hernández Montes, Miriam Enríquez, Miguel Angel Garibay, Verónica, etc., etc., etc.

A la doctora Angelina Quintero Ruiz y a José Dolores Solano Becerra, por su incondicional y atento apoyo.

A los compañeros del laboratorio 202.

A la doctora María Elena Ibarra Rubio, por su valiosa ayuda durante el trabajo realizado en el transcurso de la huelga.

<b>CONTENIDO</b>	Pág.
Abreviaturas utilizadas.....	5
<b>I.-<u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.-Oncogenes y genes supresores tumorales</b> .....	<b>8</b>
<b>I.2.-Epidemiología del cáncer</b> .....	<b>10</b>
<b>I.3.-Expresión genética</b> .....	<b>11</b>
<b>I.4.-Apoptosis</b> .....	<b>14</b>
<b>I.5.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	<b>17</b>
<b>II.-<u>ANTECEDENTES</u></b> .....	<b>19</b>
<b>II.1.-Epidemiología del cáncer colorrectal</b> .....	<b>19</b>
<b>II.2.-Estadificación y pronóstico</b> .....	<b>21</b>
<b>II.3.-Modelo de Fearon y Vogelstein</b> .....	<b>23</b>
<b>II.4.-Familia Bcl-2</b> .....	<b>25</b>
II.4.1.Características estructurales.....	26
II.4.2.-Características particulares de Bcl-2 y Bax.....	31
II.4.3.-Interacción con otras proteínas .....	38
II.4.4.-Posibles mecanismos de acción.....	39
<b>II.5.-Familia Bcl-2 y cáncer colorrectal</b> .....	<b>42</b>
<b>II.6.-Familia Bcl-2 y ciclo celular</b> .....	<b>45</b>
<b>II.7.-Razón Bcl-2/Bax</b> .....	<b>48</b>

<b>III.-<u>OBJETIVO</u></b> .....	51
<b>IV.-<u>HIPÓTESIS</u></b> .....	51
<b>V.-<u>METODOLOGÍA</u></b> .....	52
<b>V.1.-Extracción de ARN</b> .....	52
<b>V.1.1.-Extracción del ARN total</b> .....	52
<b>V.1.2.-Determinación de la pureza, concentración e integridad del         ARN obtenido</b> .....	55
<b>V.2.-RT-PCR</b> .....	62
<b>V.2.1.-Reacción de la transcriptasa inversa</b> .....	62
<b>V.2.2.-Reacción en cadena de la polimerasa</b> .....	64
<b>V.2.3.- Electroforesis del producto de la reacción de PCR</b> .....	69
<b>V.3.-Densitometría</b> .....	71
<b>VI.-<u>RESULTADOS</u></b> .....	72
<b>VII.-<u>DISCUSIÓN</u></b> .....	93
<b>VIII.-<u>CONCLUSIONES</u></b> .....	100
<b>IX.-<u>REFERENCIAS</u></b> .....	101
<b>X.-<u>APÉNDICE</u></b> .....	111

## ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIF: Apoptosis Inducing Factor

Apaf-1: Apoptogenic protease activating factor 1

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

$\beta$ 2m: beta-2-microglobulina

Cdk: Cyclin dependent kinase

cDNA: Complementary Desoxyribonucleic Acid

ced-3: gen de *Caenorhabditis elegans* homólogo a los genes humanos de las caspasas

ced-4: gen de *Caenorhabditis elegans* homólogo a Apaf-1

ced-9: gen de *Caenorhabditis elegans* homólogo a bcl-2

cyt c: citocromo c

DEPC: Dietilpirocarbonato

egl-1: gen de *Caenorhabditis elegans* homólogo a la subfamilia BH3.

GTP: Guanisin Trifosfato

MMLV-RT: Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

oligo(dT): oligonucleótido constituido de residuos de timidina

ORF: Open Reading Frame, o marco abierto de lectura

PCR: Polimerase Chain Reaction

RT: Retrotranscriptasa

snRNA: small nuclear ribonucleic acid

snRNP: small nuclear ribonucleoprotein

Taq pol: *Thermus aquaticus* DNA polimerase

Nota: Los nombres de los genes se presentan escritos con letras minúsculas, su o sus productos proteicos se indican con la letra inicial mayúscula.

# I.-INTRODUCCIÓN

Con el nombre de cáncer se denomina a un conjunto de enfermedades caracterizadas por una acumulación inadecuada de tejido, lo cual es el resultado de un trastorno en el crecimiento celular y tisular. Esta acumulación inadecuada es más evidente cuando compromete la función de los órganos en los cuales se desarrolla, lo que finalmente es lo que puede ocasionar la muerte del organismo que lo padece (1,44).

Actualmente, se acepta que el cáncer es producto de la acumulación de alteraciones a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN), las cuales se reflejan en modificaciones del fenotipo celular. Un modelo de progresión del cáncer de tejido epitelial (44) propone que inicialmente ciertas alteraciones genéticas inducen un trastorno en la proliferación celular, lo que conlleva a una hiperplasia, que es la acumulación de células que no presentan aún ninguna alteración en sus características funcionales ni morfológicas. Posteriormente, al acumularse más alteraciones genéticas, algunas células empiezan a presentar modificaciones morfológicas y funcionales y es entonces cuando se dice que se tiene una displasia; en esta etapa, las células empiezan a perder las características propias del tejido al cual pertenecen y como consecuencia, el órgano afectado no realiza adecuadamente sus funciones. La adquisición y acumulación de un mayor número de alteraciones genéticas deforma aún más la apariencia, el crecimiento y la funcionalidad celular y tisular pudiendo las células displásicas empezar a invadir los tejidos circundantes, en ese momento, en el que las células inician el proceso invasivo, se da la transición de una lesión preneoplásica a un cáncer (13). La evolución de la enfermedad podría conferir a las células tumorales la capacidad de invadir el torrente sanguíneo e iniciar el desarrollo de un nuevo tumor en un

sitio diferente al original; en otras palabras, el tumor adquiriría capacidad metastásica, que es una de las características de los tumores malignos (13).

La mayoría de las neoplasias son de origen monoclonal (2), lo que significa que la masa tumoral completa tuvo su origen en una sola célula, la cual en determinado momento de la vida del individuo experimentó una alteración o una serie de alteraciones que le confirieron una mayor capacidad de proliferación o de sobrevivencia y, a partir de ella, sus descendientes acumularon más alteraciones las cuales finalmente llevaron al desarrollo del tumor. La adquisición de un mayor número de alteraciones genéticas en las células tumorales se ve favorecida por el hecho de que estas células presentan una enorme inestabilidad genética comparada con las células normales, lo que conduce a pérdida de fragmentos cromosomales, amplificación genética, mutaciones puntuales, etc. Así mismo, la inestabilidad genética puede conducir a lo que se conoce como progresión tumoral (3,5), que es la tendencia de un tumor a volverse más agresivo en sus características clínicas y biológicas conforme pasa el tiempo. Esta misma inestabilidad genética contribuye a la heterogeneidad tumoral (4), que es la aparición, dentro de un mismo tumor, de diferentes subpoblaciones celulares, cada una con características propias. Estas diferentes subpoblaciones difieren entre sí en muchos aspectos, como puede ser: capacidad metastásica, morfología celular, histología, velocidad de crecimiento, etc., además, conforme pasa el tiempo las subpoblaciones predominantes van cambiando dependiendo de la viabilidad de las nuevas variantes generadas y de las presiones selectivas que existen en el ambiente en el cual se desarrolla el tumor, como pueden ser infiltrados inmunes, agentes terapéuticos, estatus hormonal del hospedador, presencia o ausencia de factores de crecimiento, entre otros; ello conduce a una selección clonal y a una variación continua de

las características del tumor, lo que explicaría en parte la generación de resistencia a diferentes agentes antineoplásicos por parte de un tumor dado.

Por otra parte, no existe una base común para el inicio del cáncer o, dicho en otras palabras, las vías que pueden llevar al desarrollo de un proceso neoplásico son múltiples, ello como consecuencia de la complicada red de mecanismos que regulan la vida, la muerte y la proliferación de las células (6); de esta forma, incluso neoplasias que afectan a un mismo órgano podrían tener diferente origen (77). Además, como en cada órgano se expresa un conjunto distinto de genes, la alteración de algunos de ellos puede tener mayor importancia en el proceso neoplásico de cierto tejido y ser de menor importancia en otros sitios.

### **I.1.-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES:**

Como se mencionó, el cáncer surge como consecuencia de alteraciones a nivel genómico, por lo tanto, en el desarrollo de un proceso neoplásico están implicados los genes, en este caso juegan un papel determinante genes que se han clasificado en dos grandes grupos, por un lado están los oncogenes (7) y por otro los genes supresores tumorales (7,8). Algo que tienen en común ambos grupos es que están implicados en la regulación del crecimiento celular y además se expresan también en células normales, sólo que, en este contexto, su expresión está estrictamente regulada, mientras que en las células tumorales su expresión se ha visto alterada.

En una célula normal existen genes reguladores del crecimiento celular que se denominan proto-oncogenes, ya que cuando se ven alterados en su expresión o estructura pueden inducir una proliferación descontrolada de la célula que puede derivar en una neoplasia y, bajo estas circunstancias, pasan a denominarse oncogenes. Estos proto-oncogenes codifican para proteínas que desempeñan diversas funciones, como puede ser: factores de crecimiento, factores de transcripción, proteín-cinasas o fosfatasas encargadas de la transducción de señales al interior de las células, receptores para factores de crecimiento, etc. Los proto-oncogenes favorecen el desarrollo del cáncer al activarse o, dicho de otra manera, al sufrir cambios que estabilizan a la proteína o que incrementan su producción, de manera que obtienen una ganancia en su funcionalidad (8, 9), así, basta que un solo alelo se altere para incrementar la probabilidad de desarrollar cáncer. Algunos ejemplos de proto-oncogenes son los llamados ras, myc, fos, jun.

Los genes supresores tumorales codifican para proteínas con diversas funciones y, a la inversa de lo que ocurre con los oncogenes, favorecen la aparición del cáncer al inactivarse o perder su función normal (8,9). Puesto que los humanos somos diploides, generalmente se necesita que los dos alelos que se tienen estén inactivos. Ejemplos de genes supresores tumorales son p53 y Rb.

Estos y otros genes están formados por una región reguladora, la cual generalmente no se transcribe, y por una región estructural, la cual sí se transcribe y cuya secuencia de nucleótidos contiene un marco de lectura que puede ser traducido a proteína. Ahora bien, un gen puede verse alterado por mutaciones en cualquiera de estas regiones. En caso de verse afectada la región reguladora, es muy probable que se vea afectado su grado de expresión y no la actividad del producto proteico codificado por ese gen, esta región

contiene secuencias como el promotor, que son reconocidas por factores de transcripción y por la ARN polimerasa, por lo tanto, una modificación en esta región puede conducir ya sea a un incremento o a un decremento en la expresión de un gen. Por otro lado, si la mutación se da en la región estructural, es probable que se vea afectada la función de la proteína codificada por el gen y no su grado de expresión.

## **I.2.-EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER**

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en varios países. Datos obtenidos en los Estados Unidos indican que el cáncer es la segunda causa de muerte (después de las enfermedades cardíacas) y en ese país una de cada tres personas desarrolla alguna vez en su vida algún proceso neoplásico y una de cada cuatro muere por esta causa (11).

Existe evidencia que indica que el cáncer es producto de la interacción entre factores ambientales y genéticos, como es el hecho de que ciertos tipos de cáncer sean prevalentes en ciertas regiones y cambien con el tiempo y con los movimientos migratorios (12). Sin embargo, se sabe que existen ciertas neoplasias que tienen un carácter hereditario y en ellas la composición genética del organismo juega un papel más importante que su interacción con el ambiente.

### I.3.-EXPRESIÓN GENÉTICA

Un gen se compone de una región reguladora y de una región estructural, sirviendo la región reguladora como sitio de unión para factores de transcripción. La región estructural de los genes eucariotas está integrada por secuencias codificadoras denominadas exones y por regiones no codificantes llamadas intrones, estos intrones y exones se encuentran intercalados unos con otros y su arreglo puede ser diferente para un mismo gen que se expresa en diferentes tejidos o en diferentes etapas de crecimiento de una misma célula (14), ello trae como consecuencia que un mismo gen pueda generar proteínas que difieran en estructura y función dependiendo de la etapa de crecimiento en la que se encuentre la célula o del tejido de que se trate.

Para entender mejor este fenómeno se procederá a explicar cómo es que ocurre el proceso de expresión de un gen, aclarando antes que la síntesis de ARN ocurre en la dirección 5'-3' y, por lo tanto, la lectura del ADN molde se hace en dirección 3'-5'. Además, a la cadena molde de ADN se le conoce como cadena molde ó cadena no codificante o antisentido, mientras que a la cadena complementaria, la cual tiene la misma secuencia que el ARN resultante, se le conoce como cadena codificante o cadena con sentido. Las secuencias dadas de aquí en adelante corresponderán a la cadena con sentido del ADN.

Inicialmente, el ADN tiene que transcribirse a ARN, el cual puede ser ribosomal, (ARNr), de transferencia (ARNt) o mensajero (ARNm). En los eucariotas, el ARNr es producido por la ARN polimerasa I, el ARNt por la ARN pol III, y el ARNm es producido por la ARN polimerasa II. Estas enzimas para su interacción con el ADN, requieren de factores de transcripción, algunos de los cuales interaccionan específicamente con

secuencias localizadas en el promotor del gen conocidas como elementos de control. Un importante elemento de control es el conocido como “caja TATA”, que es una secuencia rica en A y T que se encuentra 20 a 30 pares de bases (pb) río arriba del inicio de la transcripción, este elemento de control interacciona con el factor de transcripción TFIID y parece fijar el inicio de la transcripción. Los promotores de la ARN pol II contienen muchos y variados elementos de control, característica que los diferencia de aquéllos de las ARN pol I y III y que se comprende mejor si se considera la enorme diversidad de genes codificantes que existen y el que la expresión de cada uno de ellos se regula de manera distinta (14).

La interacción del ADN molde con los factores de transcripción genera el complejo de iniciación, una vez formado éste, la ARN polimerasa II avanza sobre el ADN que le sirve como molde, transcribiendo el ADN más allá del final del gen, hasta llegar a una región que presenta una o más secuencias AATAAA; el ARN naciente que lleva esta secuencia es entonces cortado por una endonucleasa que reconoce esta secuencia, el corte se hace entre 11 y 30 residuos hacia el extremo 3' de esa secuencia. Una vez cortado, al ARN se le adicionan cerca de 200 residuos de ácido adenílico en el extremo 3'. El ARN resultante se conoce como ARN inmaduro o pre-ARNm y permanece en el núcleo, este pre-ARNm contiene intrones y exones. Al pre-ARNm se le adiciona en el extremo 5' un residuo de GTP con orientación inversa, unido con el nucleótido que formaba el extremo 5' por medio de un enlace trifosfato con configuración 5'-5', esta modificación ocurre tan pronto como el extremo 5' del pre-ARNm es liberado por la ARN pol II. Este residuo de guanina, junto con los dos primeros nucleótidos de la cadena original, forman lo que se conoce como el “capuchón” o “gorro” del ARNm. Este capuchón sirve para reconocer y

situar el ARNm sobre el ribosoma previo a su traducción. Posteriormente, el pre-ARNm se empalma, o sea, se eliminan intrones y se unen los exones. En este proceso intervienen pequeños ARNs nucleares (snRNA) asociados a ciertas proteínas, formando un complejo conocido como partículas de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) que se denominan U1, U2 y así sucesivamente. Estas ribonucleoproteínas se asocian al pre-ARNm reconociendo ciertos nucleótidos en la frontera exón-intrón, al complejo resultante de la interacción entre estas ribonucleoproteínas y el ARN se le conoce como empalmosoma. Una vez empalmado, el ARNm está maduro y es transportado al citoplasma, en donde será traducido a proteína (14).

La estabilidad del ARNm eucariota es mayor que el de los procariotas, teniendo en los primeros un tiempo de vida media de 4 a 24 horas y en los segundos alrededor de 2 minutos. Aún no se ha establecido qué factores son los que determinan la menor o mayor estabilidad del ARNm eucariota (16).

Una vez en el citoplasma, el ARNm es traducido a proteína, la cual es la que lleva a cabo la acción biológica de la información codificada en los genes. Muchas veces, el producto proteico es modificado postraduccionalmente, adicionándose a la proteína cadenas que pueden ser de carbohidratos o lípidos. Además, algunas proteínas son sintetizadas en forma tal que no son activas y requieren alguna modificación distinta a la conferida por los residuos de carbohidratos o lípidos para activarse, una de las modificaciones más importantes de este tipo es la fosforilación, catalizada por cinasas de proteínas. Incluso en algunas circunstancias, la proteína tiene que ser desfosforilada para activarse, interviniendo en este proceso enzimas con actividad de fosfatasa de proteínas. En otros casos la proteína tiene que ser fragmentada por proteasas, ya sea para activarse o para inactivarse.

## I.4.-APOPTOSIS

Durante el desarrollo de un organismo, éste va experimentando cambios morfológicos, mismos que se relacionan con la diferenciación y el recambio celular. Durante este proceso, algunas células son eliminadas a través de la activación de un programa genético que conduce al suicidio celular o apoptosis (26).

Los cambios morfológicos que presentan las células apoptóticas son muy similares independientemente del tipo celular de que se trate, ello ha conducido a la hipótesis de que podría haber un mecanismo general compartido por la mayoría, si no es que por todas, las células de un organismo (17); por otra parte, si bien las características morfológicas son similares, las vías que pueden conducir a apoptosis parecen ser múltiples. La facilidad y rapidez con que se activa el programa mortal parece variar de un tipo celular a otro y de un estado de desarrollo a otro en una misma célula. Por lo tanto, el efecto de cualquier estímulo depende de manera importante del tipo celular y de la etapa del desarrollo de la célula y posiblemente de otras señales ambientales (19,45).

La apoptosis juega un papel importante no solo en el desarrollo normal de un organismo si no también en diversas enfermedades genéticas y adquiridas (17), entre ellas el cáncer. Se ha propuesto que el fallo en la respuesta apoptótica podría ser un evento que favorecería el desarrollo de esta enfermedad y, una vez implantada ésta, la falla en la respuesta apoptótica favorecería a su vez la generación de resistencia frente a defensas naturales y a la terapia clínica (19).

Se ha postulado que la apoptosis podría ser un mecanismo de defensa del organismo frente a un desarrollo celular descontrolado. Algunos autores han sugerido que podría haber una especie de "umbral" frente a diversos estímulos apoptóticos, este umbral vendría

determinado por el ambiente que existe tanto en el interior como en el exterior de la célula, esta teoría se basa en la observación de que ciertas células cancerosas son más sensibles a estímulos apoptóticos que su contraparte normal (20). Otros autores, basándose en la observación de que, como se explicará más adelante, la mitocondria juega un papel central en el proceso apoptótico, han propuesto que la apoptosis mediada por componentes de este organelo es un mecanismo que se adquirió para proteger al organismo frente a daños acumulados en el ADN mitocondrial, lo cual podría conducir a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno, lo que a su vez podría dañar al ADN nuclear y provocar la transformación de la célula (23).

Por otra parte, se piensa que una progresión ordenada del ciclo celular es un requisito para la viabilidad celular y que cualquier alteración en este proceso puede desencadenar la apoptosis. También, se ha propuesto que la apoptosis sólo pudiera inducirse en ciertos tipos celulares ó que ciertos estímulos apoptóticos indujeran o potenciaran las vías que conducen a ella sólo en las células donde el fenómeno puede ocurrir naturalmente bajo ciertas condiciones fisiológicas, de esta hipótesis se deriva que los tumores que respondan a ciertas formas de terapia sean aquellos derivados de tejidos "predispuestos" a la apoptosis (21).

La familia de genes Bcl-2 juega un papel muy importante en este proceso, está integrada por miembros pro y anti-apoptóticos, los cuales se cree que son capaces de interactuar entre ellos y con otras proteínas, formando homo y heterodímeros (23,24,25,39).

Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de ciertos componentes mitocondriales en la apoptosis como son el citocromo c y factores inductores de apoptosis

(AIF; 23, 24), así como ciertas proteasas denominadas caspasas, que a su vez activan a otras proteasas y nucleasas que degradan el contenido celular.

Si bien las vías completas que conducen a los cambios observados en las células apoptóticas no se han dilucidado, ya se tienen nociones sobre algunas partes de ellas. En algunos casos, la liberación del citocromo c del espacio intermembranal mitocondrial precede a la activación de las caspasas, al liberarse esta molécula, interacciona con una proteína citosólica denominada Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), el complejo formado puede interactuar con la caspasa-9, la cual se autoactiva y posteriormente, activa a la caspasa-3 y ésta a otras proteasas conduciendo finalmente a apoptosis (24).

En lo que al cáncer se refiere, un mayor conocimiento de las vías apoptóticas permitirá tener más elementos para pronosticar con mayor confiabilidad la evolución de un tumor y para diseñar fármacos con mayor especificidad que los actuales. Además, puesto que una sobrevivencia celular anormalmente prolongada puede ser un punto importante de inicio en la tumorigénesis, al favorecer la acumulación de alteraciones en el ADN, y puesto que la mayoría de los fármacos utilizados para tratar el cáncer destruyen las células al activar el programa apoptótico, la evolución de la enfermedad podría verse modificada cambiando el punto de inicio o el umbral a partir del cual las células desarrollen apoptosis. Alterando el umbral de muerte celular, las células cancerosas podrían volverse más sensibles a la quimioterapia. Por ejemplo, en cánceres que sobre-expresan Bcl-2, la reducción de su expresión podría hacer que las células con alteraciones genéticas intolerables mueran, al mismo tiempo que podrían volverse más sensibles a la quimioterapia (50).

## I.5.-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Esta técnica se utiliza para amplificar secuencias específicas de ADN haciendo uso de pequeños fragmentos de ADN específicos de la secuencia que se busca amplificar y de una polimerasa de ADN termoestable.

Una mezcla de reacción debe incluir los siguientes componentes:

\*Magnesio, el cual desempeña un papel importante en la transferencia de grupos fosfato durante la síntesis de ADN a partir de nucleótidos trifosfatados.

\*Amortiguador de reacción, para conferir un pH adecuado al medio de reacción, además de algunos de sus componentes como la gelatina o la albúmina sérica bovina, que ayudan a estabilizar la enzima.

\*Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), que vienen siendo los bloques a partir de los cuales se construirá el ADN.

\*Oligonucleótidos o iniciadores que son los fragmentos cortos específicos que flanquean la región del ADN que se desea amplificar.

\*ADN a amplificar, que procede de la muestra biológica en estudio.

\*ADN polimerasa, generalmente la que se emplea es la ADN polimerasa proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq pol).

Una vez que se tiene preparada la mezcla de reacción, se somete al proceso de amplificación, el cual se realiza en un aparato denominado termociclador. Este equipo hace posible la amplificación del ADN al proporcionar ciclos de variación de la temperatura que permiten que se lleven a cabo las etapas necesarias para dicho evento, las cuales son: desnaturalización de la doble cadena de ADN, alineación de los oligonucleótidos con el ADN patrón y polimerización del ADN por la Taq pol, estos tres eventos ocurren a temperaturas aproximadas de 94°C, 45-65°C y 72°C respectivamente.

La reacción en cadena de la polimerasa puede emplearse para evaluar la expresión genética si se combina con la reacción de la transcriptasa inversa o transcriptasa reversa (RT). Esta enzima permite generar ADN a partir de moldes de ARN, el ADN obtenido recibe el nombre de cDNA o ADN complementario, el cual se diferencia del ADN genómico en presentar empalmados los exones y carecer de intrones. La reacción de la RT necesita también de un oligonucleótido complementario al ARN que se desea evaluar, el cual será ARNm si lo que se busca es evaluar la expresión de ciertos genes. Para el caso del ARNm generalmente se emplea un oligonucleótido de desoxitimidina, llamado también oligo(dT), el cual se asocia a la cola de poli(A) característica del ARNm.

En esta reacción se convierte a cDNA todo el ARNm que posea la cola de poli(A) presente en la muestra; para evaluar la expresión de los genes de interés, se utilizan oligonucleótidos específicos en la reacción de PCR.

Esta reacción de RT-PCR, como también se le conoce, puede ser semicuantitativa y permitir conocer el grado de expresión de genes diferentes si se establecen las condiciones adecuadas.

Una reacción de PCR guarda una relación lineal entre el número de ciclos y la cantidad de ADN producido, esto hasta los 30 ciclos aproximadamente, después de ello la reacción se satura y la cantidad de ADN producido no varía significativamente con un mayor número de ciclos, ello provoca una pérdida de linealidad y ya no es posible comparar el nivel de expresión de dos o más genes bajo estas condiciones (42), por lo tanto, si se desea por ejemplo, determinar si en cierto tejido o en ciertas células un gen se expresa en mayor grado que otro gen, se deben emplear condiciones que se sitúen dentro del rango lineal de la reacción.

## II.- ANTECEDENTES:

### II.1.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

En México, los Estados Unidos y Europa Occidental, el cáncer colorrectal ocupa el segundo lugar en muertes debidas al cáncer. Esta enfermedad parece afectar por igual a hombres y mujeres, predominando en individuos de clase económica alta que viven en zonas urbanas y el factor de riesgo principal es la edad. El 90% de los pacientes que desarrollan cáncer colorrectal esporádico es mayor de 60 años y esta enfermedad es rara en pacientes menores de 50 años. Aproximadamente del 5 al 10% de los individuos que desarrollan la enfermedad presentan algún factor de riesgo establecido, como puede ser: colitis ulcerativa crónica, colitis crónica de Crohn, poliposis adenomatosa familiar (PAF), síndrome de cáncer colorrectal hereditario no poliploideo, antecedentes familiares de cáncer o adenoma colorrectal, antecedentes de cáncer de mama, de ovario o uterino (27,28). A diferencia de lo que ocurre en los países desarrollados, en donde la mortalidad por cáncer colorrectal ha venido disminuyendo en los últimos años, en México la mortalidad se ha incrementado en casi 100% de 1980 a 1993, lo que sitúa al cáncer colorrectal como un importante problema de salud pública a nivel nacional (101).

Se cree que la mayoría de los casos de cáncer colorrectal se inician a partir de pólipos adenomatosos, los cuales se han encontrado en más del 30% de los individuos mayores de 50 años, sin embargo, menos del 1% de estos adenomas se vuelven malignos (26,27).

Los individuos que tienen parientes de primer grado con cáncer colorrectal o poliposis adenomatosa presentan una mayor probabilidad de desarrollar el proceso neoplásico (27).

La mayoría de los expertos actualmente creen que quienes desarrollan cáncer colorrectal presentan cierta predisposición genética y es esta predisposición, junto con la interacción con factores ambientales, lo que modula el riesgo de desarrollar cáncer. Algunos factores ambientales que se cree que puedan incrementar el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal son: una dieta baja en fibra y alta en grasas, un estilo de vida sedentario, sobrepeso, el tabaquismo, el alcoholismo, una dieta baja en selenio y un bajo consumo de ácido fólico. Los factores ambientales que se cree que podrían reducir el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal son: una dieta con un alto contenido de fibra, baja en grasas y rica en calcio, así como la aspirina y los anti-inflamatorios no esteroideos(27).

## II.2.-ESTADIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

El intestino está formado por cuatro capas distintas de tejido. La más externa, que está en contacto con el contenido intestinal, es la mucosa; le sigue la submucosa, después una capa muscular o muscularis y finalmente la serosa, después de esta última capa se encuentra una región que presenta una gran cantidad de ganglios linfáticos, denominados placas de Peyer.

El pronóstico del cáncer colorrectal se relaciona con la profundidad de penetración del tumor en la pared intestinal y la presencia o ausencia de afección a ganglios linfáticos y metástasis distantes. El método de clasificación que incorpora estas variables y que con más frecuencia se usa es el de Dukes', el cual divide al cáncer colorrectal en seis etapas, que son: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y D. Recientemente el sistema de Dukes' se ha correlacionado con un método de clasificación denominado TNM, en donde la T representa la profundidad de penetración del tumor, la N la presencia o ausencia de afección de ganglios linfáticos y la M la existencia o no de metástasis distantes. A continuación se presenta la tabla I en la que se observa la relación entre estos dos sistemas de clasificación y la descripción de cada etapa, así como el pronóstico para cada una (28):

**TABLA I.- CORRESPONDENCIA ENTRE LOS DOS SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN EMPLEADOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL. SE PRESENTA LA DESCRIPCIÓN DE CADA ETAPA Y LA SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS.**

Dukes'	TNM	DESCRIPCIÓN	SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS
Etapa	Etapa		
A	T1N0M0	Infiltración no más profunda que la submucosa	>90%
B <sub>1</sub>	T2N0M0	Infiltración de la capa muscular, sin penetración de la pared intestinal, sin afección de los ganglios linfáticos.	85%
B <sub>2</sub>	T3-4N0M0	Diseminación a través de la pared colónica, sin afección de ganglios linfáticos.	70-75%
C <sub>1</sub>	T2N1M0	Infiltración de la capa muscular, sin penetración de la pared intestinal, con afección de ganglios linfáticos.	35-65%
C <sub>2</sub>	T3-4N1M0	Diseminación a través de la pared colónica, afección de ganglios linfáticos.	35-65%
D	TXNXM1	Metástasis distantes.	<5%

Actualmente la extirpación quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo para esta enfermedad (74).

### II.3.-MODELO DE FEARON Y VOGELSTEIN

En 1990, Fearon y Vogelstein proponen un modelo para el desarrollo del cáncer colorrectal basándose en la información recopilada hasta ese momento, el cual incluía la identificación de varias alteraciones genéticas. Ellos parten del hecho de que para tratar de entender mejor la evolución de un tumor, deben buscarse alteraciones genéticas características en las diferentes etapas del tumor. De este modo, en el modelo de Fearon y Vogelstein se propone que la neoplasia es producto de una serie de alteraciones genéticas que modifican el patrón de crecimiento celular normal (28) y su importancia radica en que podría ser aplicable a otros neoplasmas epiteliales.

En este modelo, los investigadores asumen que aquellas alteraciones genéticas presentes en todas o casi todas las células de tumores colorrectales de distintos pacientes, pudieron, en algún momento determinado, haber conferido a una célula tumoral una ventaja de crecimiento sobre sus vecinas, generando de esta manera una población celular predominante de origen monoclonal (30).

Las características principales de este modelo son:

- Asume que el cáncer colorrectal es producto de una activación de oncogenes acoplada a la inactivación de genes supresores tumorales.
- Se requiere que al menos 4 o 5 genes estén alterados para que se presente un tumor maligno.
- Es la acumulación de alteraciones la que determina las características biológicas del tumor y no el orden en el cual éstas van apareciendo.

Las principales alteraciones genéticas que incluye este modelo son:

Mutaciones en el oncogén ras, pérdidas de fragmentos cromosomales o pérdidas alélicas, las cuales generalmente afectan sólo a un cromosoma de cada par. Las pérdidas de fragmentos cromosomales más frecuentes son: la de la región 5q, la de la región 17p y la de la región 18q (29).

Además de la mutación en ras y de las pérdidas de fragmentos cromosomales, otra alteración frecuente en el cáncer colorrectal es la pérdida de grupos metilo en el ADN de las células neoplásicas, esta falta de metilación podría conducir a una falta de disyunción mitótica, lo que resultaría en una pérdida o ganancia de cromosomas; por lo tanto, cambios epigenéticos como éste podrían acentuar la inestabilidad del genoma e incrementar la aparición de alteraciones genéticas tales como pérdidas alélicas (29).

La secuencia de aparición de las diferentes alteraciones parece no ser tan importante como la acumulación de las mismas, ya que se dan casos en los que algunos adenomas presentan alteraciones presentes en los carcinomas y en estos últimos rara vez se presentan menos de cuatro de las alteraciones mencionadas; sin embargo, existen adenomas con las cuatro alteraciones principales (mutación en ras, pérdidas alélicas en 5q, 17p y 18q) lo que indica que incluso estas alteraciones podrían no ser suficientes para generar un fenotipo neoplásico.

Si bien se ha avanzado mucho desde 1990 a la fecha, el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein proporciona los cimientos sobre los cuales se podría seguir construyendo una estructura que nos permita lograr un mayor entendimiento de la evolución del cáncer colorrectal, con la posibilidad de poder aplicar dicho modelo a otros cánceres del tejido epitelial.

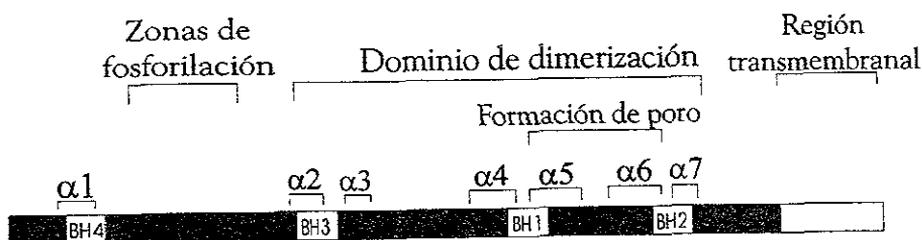
## II.4.- FAMILIA BCL-2

La "Familia Bcl-2", recibió este nombre debido a que el gen *bcl-2* fue el primer miembro de esta familia que se descubrió (61) asociado al linfoma de células B (*B Cells Lymphoma*); (38). La capacidad anti-apoptótica de Bcl-2 se descubrió al observarse que favorecía la supervivencia de células hematopoyéticas dependientes de IL-3 después de retirar esta citocina del medio de cultivo (33). Actualmente esta familia comprende miembros tanto anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1) como pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bok); (54,63) y se clasifican como miembros de ella por compartir secuencias específicas de aminoácidos. Estudios previos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* revelaron la existencia de genes que podían regular el proceso apoptótico, los cuales fueron denominados *ced-9*, *ced-4* y *ced-3*. Estos genes presentaban en cierto modo funciones opuestas, ya que el producto de *ced-9* era capaz de evitar la muerte celular programada de células que debían ser eliminadas en cierta etapa del desarrollo del gusano, mientras que las proteínas codificadas tanto por *ced-3* como por *ced-4* eran necesarias para que ocurriera el proceso apoptótico. Actualmente se sabe que *ced-9* es el homólogo de *bcl-2*, *ced-3* es el homólogo de las caspasas y *ced-4* es el homólogo de Apaf-1 (31,32).

La familia de genes Bcl-2 últimamente ha llamado la atención por sus posibles implicaciones en lo que a la evolución del cáncer se refiere. Esta familia de oncogenes, a diferencia de las anteriores, más que favorecer una proliferación celular descontrolada lo que provoca es una reducción en la mortalidad celular normal, dicho en otras palabras, induce una supervivencia celular mayor a la normal (33).

## II.4.1.- Características estructurales

Se mencionó que las proteínas de la familia Bcl-2 compartían secuencias de aminoácidos, estas secuencias se cree que dan origen a ciertos dominios proteicos esenciales para la formación de homodímeros y heterodímeros, ya sea con miembros de la familia Bcl-2 o con otras proteínas no homólogas. Estos dominios se denominan BH1, BH2, BH3 y BH4 y una proteína de esta familia puede tener uno, dos, tres o los cuatro dos, tres o los cuatro dominios. El esquema de la proteína Bcl-2 se presenta a continuación:



**ESQUEMA 1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA BCL-2. SE INDICAN LOS DOMINIOS DE HOMOLOGÍA CON OTRAS PROTEÍNAS DE ESTA FAMILIA (DOMINIOS BH) Y LAS HÉLICES ALFA PRESENTES EN LAS DISTINTAS REGIONES DE LA PROTEÍNA, DETERMINADOS POR CRISTALOGRAFÍA.**

Aquellas proteínas con un alto grado de semejanza con Bcl-2 presentan los cuatro dominios. Entre los dominios BH4 y BH3 se localiza una región que genera un asa no conservada de aminoácidos, en la cual se localizan residuos de aminoácidos susceptibles a la fosforilación (31,49) y se cree que esta región podría ser importante en la regulación de la actividad de la proteína, como parece indicar el hecho de que la eliminación de dicha asa permite a Bcl-2 promover la sobrevivencia celular bajo condiciones en las que normalmente es inactivo (54), además, esta región se ha asociado con la capacidad de Bcl-2 para inducir a la célula a salir del ciclo celular hacia un estado G0 o para retardar la entrada

de la célula al ciclo celular (55,56,58). Esta capacidad de regular la progresión del ciclo celular es independiente de la actividad anti-apoptótica de la proteína, como lo demuestra el hecho de que la alteración de esta región (el asa no conservada) elimina la influencia de la proteína sobre el ciclo celular pero sigue protegiendo contra la apoptosis (31).

El análisis de la estructura cristalina de Bcl-xl ha revelado que existe una gran semejanza entre las proteínas tipo Bcl-2 y ciertas toxinas bacterianas, como el dominio de traslocación de la toxina de la difteria y las colicinas, las cuales tienen la capacidad de formar canales transmembranales. De hecho se ha comprobado "in vitro" que tanto Bcl-2 como Bax pueden formar estas estructuras, las cuales presentan diferentes características; por ejemplo, los canales formados por Bax permiten el paso de aniones preferentemente, y se cree que son más grandes que los formados por Bcl-2 y Bcl-xl, cuyos canales permiten preferentemente el paso de cationes (23,24,31,39). Se especula que la variabilidad en los residuos de aminoácidos y, por ende, de carga eléctrica entre los dominios BH1 y BH2, que flanquean a las hélices alfa 5 y 6, que se proponen como parte del canal transmembranal, se traduce en diferencias en la selectividad iónica de estos canales (49).

Los miembros pro-apoptóticos se dividen en dos subfamilias sobre la base de su estructura. La "subfamilia Bax" es la que presenta mayor semejanza con Bcl-2 al presentar dentro de su estructura los dominios BH1, BH2 y BH3, dentro de este grupo se encuentran Bax, Bak y Bok. La otra subfamilia recibe el nombre de "subfamilia BH3" al ser éste el único dominio que presentan estas proteínas, en este grupo se encuentran la mayoría de los miembros pro-apoptóticos (Bik, Blk, Hrk, Bad, Bid, BNIP3, BimL) (31).

El dominio BH3 parece jugar un papel determinante en la inducción de apoptosis, como lo demuestra el hecho de que el gen homólogo en *C. elegans* de la subfamilia BH3,

egl-1, es capaz de inducir apoptosis y sólo presenta el dominio BH3 (31,64). Se ha sugerido que los miembros de la subfamilia BH3 sean los verdaderos antagonistas de los miembros anti-apoptóticos y que los miembros de la subfamilia Bax presenten otros mecanismos de inducción de muerte celular (31) por ejemplo, mediante la formación de canales transmembranales (39). Aún no se define si la actividad de los miembros anti-apoptóticos es inhibida por la interacción entre éstos y los miembros pro-apoptóticos, si la actividad pro-apoptótica de ciertas proteínas es anulada por su interacción con elementos anti-apoptóticos, o si ambos grupos desempeñan sus funciones de manera independiente. En un experimento en el que se utilizaron segmentos peptídicos correspondientes al dominio BH3, se observó que éstos eran suficientes para inducir la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas, estos segmentos inducían apoptosis en sistemas libres de células, pero sólo presentaban esta actividad los segmentos provenientes de miembros pro-apoptóticos (49).

Los reportes iniciales (35) indicaban que Bcl-2 formaba heterodímeros con Bax, pero esta interacción empieza a ser dudosa al descubrirse que las sustancias detergentes empleadas en la ruptura de las células favorecen una interacción artificial entre proteínas pro y anti-apoptóticas (37). Por otra parte se ha especulado que algunos miembros anti-apoptóticos de esta familia podrían interaccionar sólo con uno o unos pocos miembros pro-apoptóticos, mientras que otros podrían tener un patrón de asociación más promiscuo, ello a partir de estudios que muestran cierta jerarquía en el patrón de interacciones que se presentan entre los miembros de esta familia (47, 48). Estos estudios dejan ver que existen prioridades entre los miembros de la familia Bcl-2 al momento de formar homo y heterodímeros, lo que podría determinar la respuesta de las células a diferentes estímulos

apoptóticos si se considera que cada patrón de dimerización podría afectar diferencialmente a la célula frente a la apoptosis y que los diferentes dímeros podrían estar conectados con otros sistemas celulares; esto, aunado al hecho de que los miembros de la familia Bcl-2 podrían tener un patrón de expresión tejido específico (63). Esta jerarquía en la formación de dímeros podría inducir el desplazamiento de alguna molécula que estuviera formando un dímero por otra que presentara mayor afinidad por el otro componente del dímero, como parece ocurrir con Bad, el cual desplaza a Bax de los dímeros Bax:Bcl-xl (49).

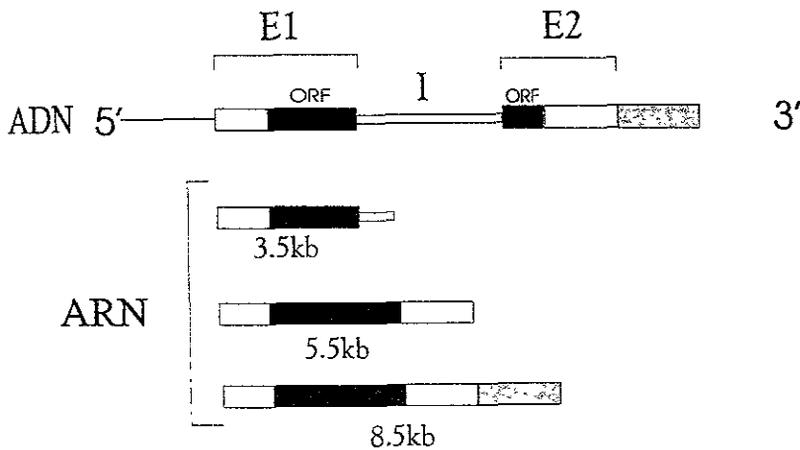
El dominio BH4 es importante en Bcl-xl porque es el que interviene en la interacción de esta proteína con Apaf-1 y se cree que por medio de esta región los miembros anti-apoptóticos podrían secuestrar a Apaf-1, o bien, este dominio podría conferir la conformación adecuada a Bcl-xl para su interacción con este supuesto adaptador de las caspasas, el cual se sabe que presenta en su región amino terminal un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) al cual se asocia la procaspasa-9 (23,31). También es el dominio BH4 el que se cree que interviene en la interacción con Raf-1, con la calcineurina y en interacciones con proteínas ajenas a esta familia, de manera semejante a lo que ocurre con Apaf-1, al estar presente en todos los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y ausente en casi todos los miembros proapoptóticos (52). Este dominio no interviene en la formación de heterodímeros con otros miembros de la familia Bcl-2 (49,54,63).

La importancia de la región transmembranal aún no está definida, su ablación reduce o suprime la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 en algunos sistemas pero no tiene ningún efecto en otros. Además, las proteínas de esta familia parecen ser capaces de interactuar con proteínas asociadas a membranas intracelulares, lo que facilita su localización en estos sitios aún en ausencia de la región transmembranal (66,67).

En estudios realizados utilizando ratones “knock-out” se observó que los ratones *bcl-2* *-/-* nacían normales pero posteriormente desarrollaban riñones poliquísticos, inmunodeficiencia por una marcada apoptosis linfoide e hipopigmentación del pelo; los ratones *bcl-xl* *-/-* morían a las pocas semanas de gestación como consecuencia de una muerte celular masiva en el sistema nervioso central (31,32), lo que indica que estos genes altamente homólogos no son simplemente redundantes, si no que exhiben claras diferencias en lo que a especificidad de linaje celular se refiere. Los ratones macho *bax* *-/-* presentan una alta tasa de muerte celular en las células germinales, son infértiles y presentan casi el doble de timocitos y células B, mientras que las hembras *bax* *-/-* presentan una acumulación de células en el ovario, por lo tanto las anormalidades fenotípicas en ratones *bax* *-/-* pueden ser hiperplasia o hipoplasia dependiendo del tipo celular. Además, debido a que los tejidos afectados en los ratones *bax* *-/-* no son los mismos que los afectados en los ratones *bcl-2* *-/-*, *Bcl-2* podría actuar independientemente de su interacción con *Bax* y viceversa. Las alteraciones que se presentan en los ratones *bax* *-/-* indican que no solamente hay una especificidad en el linaje celular, sino que además, dependiendo del tipo celular, un mismo gen puede tener efectos positivos o negativos sobre la muerte celular.

#### II.4.2.- Características particulares de Bcl-2 y Bax.

El gen *bcl-2* está localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21); (38). Un modelo (38) propone que este gen presenta al menos dos exones y genera tres diferentes ARNm, uno de 8.5 kb, otro de 5.5 kb y otro más de 3.5 kb, los tres comparten el primer exón pero solo los transcritos de 8.5 kb y 5.5 kb contienen la secuencia del segundo exón. El transcrito de 5.5 kb presenta una marco abierto de lectura (ORF, Open Reading Frame) de 717 nucleótidos y codifica para la proteína Bcl-2  $\alpha$ , el transcrito de 3.5 kb codifica para una proteína más corta denominada Bcl-2  $\beta$  que difiere de Bcl-2  $\alpha$  en su extremo carboxi-terminal. Se cree que el transcrito de 8.5 kb se desplaza más allá del final del gen. Este modelo se presenta en el esquema 2:



ESQUEMA 2.- ESTRUCTURA DEL GEN BCL-2 A NIVEL DE ADN Y ARNm.

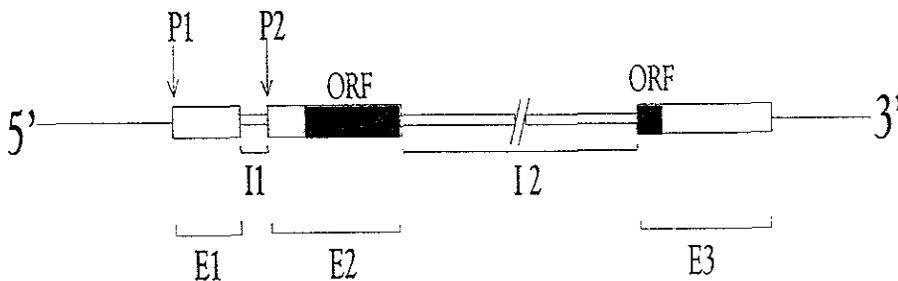
E: EXÓN

I: INTRÓN

ORF: OPEN READING FRAME

Es de esperarse que el transcrito de 8.5 kb también presente el marco abierto de lectura correspondiente a Bcl-2  $\alpha$ , pues se cree que difiere del transcrito de 5.5 kb debido a que su sitio de poliadenilación es distinto, este transcrito presenta un extremo 3' no codificante muy extenso (60,61), el cual se ha sugerido que podría desempeñar algún papel en la expresión de la proteína (61).

Otro modelo (61) propone que el gen bcl-2 se compone de tres exones presentando además dos regiones promotoras alternativas y un enorme intrón de 370 kb entre el exón II y el exón III. La estructura propuesta se presenta en el esquema 3:



**ESQUEMA 3.- ESTRUCTURA ALTERNATIVA PROPUESTA PARA EL GEN BCL-2.**

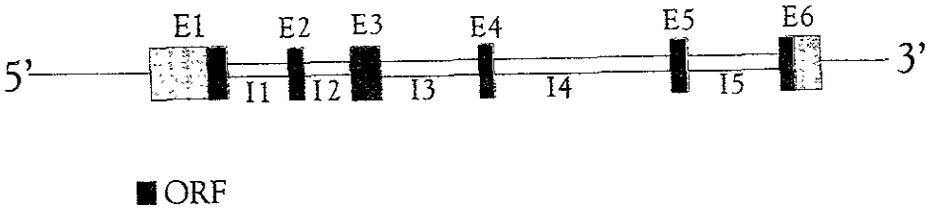
- P1.- PROMOTOR 1
- P2.- PROMOTOR 2
- E1.- EXÓN I
- E2.- EXÓN II
- E3.- EXÓN III
- I1.- INTRÓN I
- I2.- INTRÓN II
- ORF.- MARCO ABIERTO DE LECTURA (OPEN READING FRAME)

Los dos promotores difieren entre si, el promotor 1 es rico en CG, no presenta la caja TATA y tiene varios sitios que podrían servir para iniciar la transcripción. El promotor 2 presenta la caja TATA y la caja CAAT y pueden distinguirse dos sitios de iniciación de la transcripción. Se cree que estas diferencias podrían desempeñar un papel en la expresión tejido-específica o etapa-específica de Bcl-2 (62). Este gen codifica para dos variantes proteínicas producto del empalme alternativo del gen (60), Bcl-2  $\alpha$  de 239 aminoácidos y 26 kD y Bcl-2  $\beta$  de 205 aminoácidos y 22 kD (38,60). De estas variantes la que parece predominar en las células y la que más se ha estudiado es la forma alfa, referida simplemente como Bcl-2. Estas dos proteínas son idénticas en los primeros 195 aminoácidos, difiriendo en su extremo carboxi-terminal. Bcl-2  $\alpha$  presenta un segmento de 17 aminoácidos hidrofóbicos que funcionan como dominio transmembranal seguidos de 2 residuos cargados. La variante  $\beta$  no presenta este dominio transmembranal.

En estudios empleando la línea celular 32D dependiente de IL-3, las células que expresaban la variante  $\beta$  presentaban una tasa de muerte celular mayor a la que presentaban las células expresando Bcl-2  $\alpha$  y mayor aún a la que se presentaba en células control, lo que parece indicar que la variante  $\beta$  favorece la muerte celular bajo ciertas condiciones (60).

El gen bax se localiza en la posición 19q13.3-q13.4 (68) y originalmente se encontró que presentaba un marco abierto de lectura de 576 pb, el cual codificaba para una proteína de 192 aminoácidos con una masa molecular de 21.4 kD. La proteína, denominada Bax alfa, presenta un dominio transmembranal en su extremo carboxi-terminal.

Este gen presenta seis exones, todos localizados dentro de una región de 4.5 kb, la información codificante se encuentra distribuida en todos y cada uno de los seis exones (35), su estructura se presenta en el esquema 4.



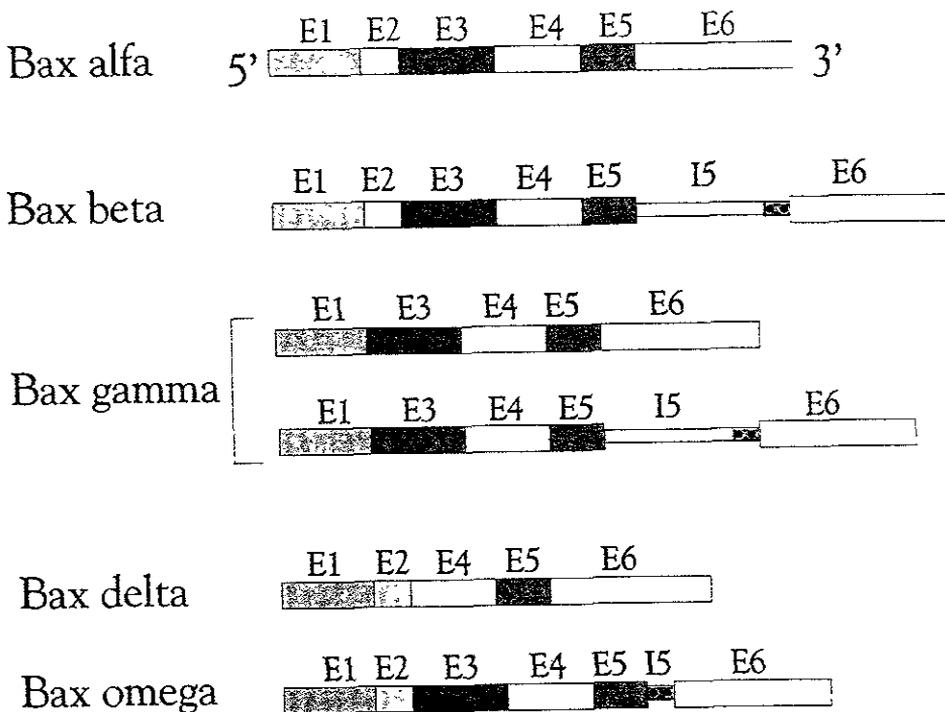
**ESQUEMA 4.- ESTRUCTURA PROPUESTA PARA EL GEN BAX.**

**E: EXÓN**

**I: INTRÓN**

**ORF: OPEN READING FRAME**

Actualmente, se sabe que el gen *bax* se transcribe en al menos 5 ARNm, cuyas estructuras se muestran en el esquema 5, estos ARNm son producto del empalme alternativo de los diferentes exones e intrones que integran al gen y, como se observa, tanto los intrones como los exones no son elementos fijos, en otras palabras, a ciertas secuencias se les denominó intrones porque se comportaban como tales en la primera forma alternativa que se descubrió, que fue *bax* alfa, pero estas secuencias pueden actuar como exones en otros transcritos alternativos y ciertas secuencias que actúan como exones en ciertos transcritos, en otros funcionan como intrones:



**ESQUEMA 5.- DISTINTOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DEL GEN BAX. LOS PRODUCTOS DE LOS TRANSCRITOS BAX GAMMA Y BAX DELTA NO HAN SIDO DETECTADOS "IN VIVO".**

La región que codifica para el dominio transmembranal se localiza en el exón 6; el transcrito para bax  $\alpha$  es el único que genera una proteína con región transmembranal. Se ha reportado que Bax  $\alpha$  favorece la supervivencia en neuronas cuando a éstas se les retiran ciertos factores de crecimiento necesarios para su supervivencia (72).

El transcrito de bax  $\beta$  codifica para una proteína de 24 kDa que posiblemente sea una forma citosólica de Bax, en este transcrito el segmento que corresponde al intrón 5

actúa como un exón y la región transmembranal no se traduce, debido a la presencia de un codón de terminación en el incorporado intrón 5 (35).

Los ARNm que corresponden a Bax  $\gamma$ , en teoría, codifican ambos para una proteína de 45 kDa, la cual no se ha reportado que se detecte en el laboratorio, en este caso el exón dos es eliminado y en un caso se conserva el intrón 5. Ambos ARNm producen la misma proteína, ya que el marco de lectura se reduce al generarse un codón de terminación en el exón 3 (35).

Bax  $\delta$  se ha detectado únicamente a nivel de ARNm y en teoría codifica para una proteína de 143 aminoácidos y carece de región transmembranal (68).

En el caso de Bax  $\omega$ , el ARNm es idéntico al de Bax  $\alpha$  hasta el exón 5, después de ese punto, el sitio donador del exón 6 se mueve 49 pb hacia el extremo 5', o lo que es lo mismo, se adicionan 49 pb del extremo 3' del intrón 5, esta adición mueve el marco abierto de lectura y se genera una proteína distinta a Bax  $\alpha$ , sin región transmembranal, puesto que a partir del nuevo sitio de empalme en el ARNm los aminoácidos codificados son distintos para estas dos proteínas. Una diferencia funcional muy importante que se ha reportado es que Bax  $\omega$  parece favorecer la sobrevivencia celular más que favorecer la apoptosis (69).

La presencia de los diferentes transcritos y sus respectivas proteínas varía de una línea celular a otra y de un tejido a otro (35) y se cree que podría ser un medio de regular los niveles de Bax funcional al no traducirse en todos los transcritos los exones 5 y 6, en los que se han situado los dominios BH1 y BH2, que son importantes para que la proteína sea funcional. También podría ser un modo de regular la expresión de proteínas con diferentes funciones procedentes de un mismo gen (69).

La proteína Bcl-2 parece tener una distribución celular definida, localizándose principalmente en el retículo endoplásmico, membrana nuclear y membrana externa mitocondrial, en este último sitio, parece situarse en los sitios de unión entre la membrana externa y la interna (52, 54).

Bax  $\alpha$  es básicamente una proteína citosólica (al menos en esplenocitos, timocitos murinos y células HL-60 de leucemia pro-mielocítica) a pesar de que presenta en su estructura un dominio que puede insertarse en la membrana (36). Al inducirse la apoptosis, la mayor parte de la proteína se dirige a la membrana mitocondrial (41).

A Bcl-2 también se le ha considerado guardián de la integridad de los microtúbulos (65) en virtud de que su actividad anti-apoptótica se ve anulada por fosforilación después de inhibirse la polimerización o la despolimerización de estas estructuras celulares por fármacos como el paclitaxel o la vincristina.. La fosforilación de Bcl-2 reduce su capacidad para formar heterodímeros con Bax. Los microtúbulos juegan un papel importante en la segregación de los cromosomas y su alteración podría provocar inestabilidad genómica, por lo que la inactivación de Bcl-2 como consecuencia de la alteración de la función de los microtúbulos podría servir para eliminar células aberrantes.

Bcl-2 puede ser inactivado por proteasas, la región variable entre los dominios BH4 y BH3 es altamente susceptible a la degradación por proteasas como tripsina y quimotripsina; además, Bcl-2 es fragmentada por la proteasa del VIH, lo que de alguna manera explica la muerte de linfocitos infectados por este virus (54). Existen reportes de que ciertas caspasas pueden fragmentar a Bcl-2 y Bcl-xl eliminando el dominio BH4, generando así proteínas truncadas que se asemejan a las proteínas de la subfamilia Bax en el arreglo de los dominio BH, esto, aunado a la observación de que la eliminación del

dominio BH4 confiere características pro-apoptóticas a estas proteínas (63,64) deja entrever otro posible mecanismo que emplean las caspasas para producir finalmente apoptosis.

#### **II.4.3- Interacción con otras proteínas**

Una diferencia importante entre los miembros pro-apoptóticos y los miembros anti-apoptóticos es la capacidad que tienen éstos últimos para interactuar con algunas proteínas que no pertenecen a la familia Bcl-2. Hasta ahora no se sabe de algún miembro pro-apoptótico que presente esta propiedad. De entre los miembros anti-apoptóticos, son Bcl-2 y de Bcl-xl aquéllos sobre los cuales más información está disponible. Se sabe que éstos inmunoprecipitan con las siguientes proteínas: con la proteín-cinasa Raf-1, calcineurina, con R-Ras (51) y H-Ras, con la proteína p53-BP2, con Pr-1, con Apaf-1, con Ced-4, con BAG-1, con Nip-1, Nip-2 y Nip-3 (52), y con Bap31 y BI-1 (39).

Es posible que la actividad de Bcl-2 y de otros miembros de esta familia sea regulada por fosforilación al interactuar con cinasas y fosfatasas, además, las evidencias parece indicar que las moléculas con las que interactúan Bcl-2 y Bcl-xl pueden moverse del citosol a los sitios de expresión de Bcl-2 y Bcl-xl (32), ello podría modificarr la función no solo de miembros de la familia Bcl-2, sino también de otras proteínas involucradas en el proceso apoptótico.

Por otra parte, la interacción de los miembros pro-apoptóticos con Bcl-2 o Bcl-xl rompe la interacción con proteínas como Apaf-1 y calcineurina, sugiriendo un mecanismo por el cual estas proteínas podrían antagonizar la función de Bcl-2 y Bcl-xl (39).

#### II.4.4.- Posibles mecanismos de acción

Entre las diferentes funciones que se han atribuido a algunos miembros de esta familia están las siguientes:

- \*Formación de poros en las membranas intracelulares.
- \*Proporcionar estabilidad a la membrana externa mitocondrial.
- \*Proteínas muelle o proteínas secuestradoras.
- \*Chaperonas o “porteros” moleculares.

La idea de que algunos miembros de esta familia podrían formar poros transmembranales surgió al determinarse la estructura cristalina de Bcl-xl y observarse la gran similitud que existía entre la estructura de esta proteína y las de la toxina de la difteria y de las colicinas. Experimentos empleando membranas sintéticas demostraron que efectivamente, tanto Bax como Bcl-2 y Bcl-xl formaban canales transmembranales, y al menos en el caso de los miembros anti-apoptóticos, esta propiedad era dependiente del pH. Los canales formados por los miembros pro- y anti-apoptóticos, como se mencionó anteriormente, presentaban diferentes características. Es posible que los canales así formados por Bax permitieran el escape del citocromo c del espacio intermembranal hacia el citosol. Esta hipótesis se ve apoyada por la observación de que en mitocondrias aisladas la adición de Bax recombinante induce la liberación de citocromo c. En lo que se refiere a la capacidad de Bcl-2 para formar canales, se cree que podría regular el flujo de protones entre el espacio intermembranal mitocondrial y el citosol, regulando de esta manera el pH del espacio intermembranal e influyendo por lo tanto en el potencial transmembranal existente entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal y con ello en la susceptibilidad o resistencia de una célula frente a diferentes estímulos apoptóticos (23,39). La pérdida del potencial electroquímico es una característica del proceso apoptótico (24).

La observación de que los miembros de la familia Bcl-2 pueden interactuar entre ellos y en algunos casos con proteínas distintas a las de esta familia generó la idea de que estas proteínas actuaran como proteínas secuestradoras. Algunas observaciones sugieren que los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-x1 podrían evitar la función de proteínas tales como Bax por medio de la dimerización, ó de otras proteínas no homólogas como cinasas y fosfatasas. Algunos estudios parecen indicar que Bcl-2 situado en los poros nucleares impide el acceso de p53 a dicho organelo, lo que podría ser parte de su mecanismo de acción anti-apoptótico. De forma alternativa, la capacidad de estas proteínas, y especialmente de los miembros anti-apoptóticos de interactuar con proteínas ajenas a esta familia podría permitir la interacción entre proteínas distintas en la superficie mitocondrial, por ejemplo, de cinasas con proteínas pro-apoptóticas, regulando su actividad mediante reacciones de fosforilación (23,32).

La posible función como chaperonas por parte de los miembros de la familia Bcl-2 surgió al observar que algunas de estas proteínas se localizan en la membrana externa mitocondrial y que la flexibilidad del apo-citocromo c, misma que permite su espontánea inserción en la membrana externa mitocondrial, se perdía al incorporarse el grupo hemo a la molécula, se especula que miembros de la familia Bcl-2 pueden intervenir en el plegamiento del citocromo c. Otra alternativa es que funcione como "portero molecular" trabajando en concierto con un sistema de chaperonas y regulando en tránsito de moléculas entre un compartimento y otro. Esta actividad le permitiría controlar procesos como la liberación del citocromo c, el movimiento de proteínas en el retículo endoplásmico y el transporte de factores de transcripción en el núcleo. La regulación de Bcl-2 a través de la

fosforilación, por medio de la interacción con otras proteínas o por proteólisis, podría transformarla de un inhibidor a un mediador del tránsito molecular transmembranal (23,39).

Bcl-2 impide la liberación de proteínas apoptogénicas como el citocromo c de la mitocondria, también impide la oxidación del lípido de la membrana interna mitocondrial cardiolipina y el desacoplamiento de la cadena respiratoria, eventos que finalmente podrían estar relacionados con un incremento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales (24).

Se cree que los miembros de la familia Bcl-2 son capaces de registrar diferentes formas de daño celular y señales tanto intracelulares como extracelulares e integrar todas ellas para finalmente decidir si la célula es eliminada o no. Un modelo propuesto sugiere que los miembros de la familia Bcl-2 integran las señales pro- y anti-apoptóticas que recibe una célula, sean señales intra o extracelulares, en este proceso de integración de señales habría una competencia entre los miembros pro-apoptóticos y los anti-apoptóticos, por ejemplo, se ha sugerido que miembros anti-apoptóticos como Bcl-xl podrían interactuar con Apaf-1 (34), secuestrándolo y manteniéndolo en una forma inactiva, proceso semejante al que ocurre en *C. elegans*, donde Ced-4, homólogo de Apaf-1, actúa como puente entre Ced-9, homólogo de Bcl-2, y Ced-3, homólogo de las caspasas; la separación de Ced-9 provoca la activación de Ced-3 por Ced-4, tal separación podrían inducirse por algún miembro de la subfamilia BH3 de promotores de muerte celular que presente una alta afinidad por Bcl-2. Los miembros pro-apoptóticos facilitarían la liberación de Apaf-1 posiblemente al interactuar el dominio BH3 de éstos con proteínas tipo Bcl-xl e induciendo un cambio en su conformación, una vez liberado Apaf-1 y en presencia del

citocromo c y de ATP (24), Apaf-1 interaccionaría con la procaspasa-9 (34), activándola e iniciando la cascada de reacciones que conducirían al desmantelamiento de la célula (31).

En un modelo se propone que la formación de homodímeros de Bax favorece el que una célula experimente apoptosis, mientras que la heterodimerización de Bax con otras proteínas tales como Bcl-2 y Bcl-xl anula la capacidad pro-apoptótica de Bax, de este modo el nivel de proteína pro y anti-apoptóticas podría actuar como un reóstato que controla hasta cierto punto el destino de un célula (37).

## **II.5.- FAMILIA BCL-2 Y CÁNCER COLORRECTAL**

En el epitelio colónico normal la expresión de Bcl-2 se restringe al tercio inferior de las criptas intestinales (zona de células basales) reduciéndose su nivel de expresión conforme las células migran a los sitios de contacto con la luz intestinal, lo que sugiere una función de esta proteína en la regulación del tiempo de vida de las células y por lo tanto un papel en la regulación del número de células en este tejido, las cuales se sabe que experimentan apoptosis al ser eliminadas hacia la luz intestinal (73,74,76,80).

Hasta ahora, no existe un acuerdo con respecto al comportamiento e importancia de los genes bcl-2 y bax en el cáncer colorrectal. En reportes en los que se evalúa la expresión de Bcl-2 a nivel de proteína en adenomas se observa que entre el 71 y el 86% expresan la proteína, en los carcinomas el porcentaje de reactividad varía desde el 22% (95) hasta el 92% (73, 74, 80), además, líneas celulares de adenoma y carcinoma colorrectal presentaban variaciones en la expresión de Bcl-2. En la evaluación de la expresión de Bcl-2 en

carcinomas y adenomas, se observó que a diferencia de lo que ocurre en el tejido normal, la expresión no presentaba el gradiente de expresión de la zona basal a la zona apical, si no que presentaba una distribución irregular. Esta aparente expresión descontrolada de Bcl-2, observada tanto en adenomas como en carcinomas, sugiere que la alteración de la expresión de Bcl-2, podría ser un evento temprano en el desarrollo del cáncer colorrectal (73,74,80) y el mantenimiento de su expresión en etapas avanzadas podría favorecer la progresión tumoral y explicar porqué el cáncer colorrectal es especialmente difícil de tratar por los fármacos quimioterápicos convencionales (73,79). Por otro lado, existen reportes en los que la mayor expresión de Bcl-2 se ha asociado a una mejor evolución del cáncer colorrectal (75, 80, 95).

En general se acepta que el proceso de transformación del epitelio colorrectal con frecuencia va acompañado de una inhibición de la apoptosis (76), este fenómeno parece ser gradual; conforme el tejido progresa de la normalidad a carcinoma, pasando por adenoma, el porcentaje de células susceptibles a morir por apoptosis se reduce, y esto, en algunos casos, se ha relacionado directamente con la mayor expresión de Bcl-2 (76). La expresión de Bcl-2 en adenomas y carcinomas se relaciona pues, con una menor susceptibilidad a la apoptosis, sin embargo, no todos los carcinomas y adenomas expresan Bcl-2 (73,78) y en algunos casos su expresión se detecta en adenomas pero no en carcinomas derivados de estos adenomas (78), estas observaciones han llevado a proponer que existe una pérdida de expresión de Bcl-2 conforme el tumor progresa a etapas más avanzadas (78,79), esta pérdida de expresión de Bcl-2, en general coincide con la sobre-expresión de p53 (78,79), y en ciertos estudios en los que se clasificó a los carcinomas como Bcl-2 +/p53 - o Bcl-2 - /p53 +, estos últimos presentaron un fenotipo más agresivo. Esto se ha asociado a la

presencia de mutates de p53, las cuales pueden bloquear la expresión de Bcl-2 pero no inducir apoptosis (78,79,80).

Al evaluar por inmunohistoquímica la expresión de varios miembros de la familia Bcl-2 en tejido normal, adenomas y carcinomas (81), se obtuvo el perfil de expresión que se muestra en la tabla 2:

**TABLA 2.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE DIFERENTES MIEMBROS DE LA FAMILIA BCL-2 EN TEJIDO NORMAL, ADENOMATOSO Y NEOPLÁSICO.**

Gen	Nivel de expresión
Bcl-2	Tejido normal > adenomas > carcinomas
Bax	Adenomas > carcinomas > tejido normal
Bcl-xl	carcinomas > adenomas > tejido normal
Mcl-1	Adenomas = tejido normal > carcinomas
Bak	Tejido normal > adenomas = carcinomas

Estos datos muestran una relación inversa en la expresión de Bcl-2 y Bcl-xl, con Bcl-xl incrementando su expresión conforme las características del tejido se vuelven más agresivas y Bcl-2 reduciendo su expresión conforme el tejido evoluciona a neoplasia, estos resultados concuerdan con los de otros estudios en los que la expresión de Bcl-xl tanto a nivel de proteína como de ARNm se incrementa en carcinomas (82), mientras que el nivel de ARNm de bcl-2 es indetectable tanto en tejido normal como en tejido canceroso. Por otra parte, al evaluar la expresión de Bax por inmunohistoquímica, se observa una distribución difusa en los tumores mientras que en el tejido normal su expresión predomina en la zona apical del epitelio intestinal, lo que sugiere que también la expresión de este miembro de la familia Bcl-2 podría estar alterada en el cáncer colorrectal, sin embargo, al

comparar el nivel de expresión entre tejido normal y carcinomas, Bax está apenas ligeramente sobre-expresado en el tejido tumoral.

Bak ha sido considerado como uno de los principales promotores de la apoptosis en el epitelio intestinal y las investigaciones indican que su expresión se encuentra reducida en carcinomas (81,82), esto, junto con la observación de que Bcl-xl incrementa su expresión en este tipo de tejido ha sugerido que el dúo Bcl-xl/Bak podría ser más importante que Bcl-2/Bax en el cáncer colorrectal (82).

## **II.6.- FAMILIA BCL-2 Y CICLO CELULAR**

Se ha reportado que Bcl-2 afecta la progresión del ciclo celular en ciertas células. Se ha observado que siempre que la sobre-expresión de Bcl-2 bloquea la apoptosis, las células sobrevivientes se acumulan en una etapa G0/G1 (55). Una observación que parece apoyar la intervención de Bcl-2 en el ciclo celular proviene de estudios realizados empleando timocitos murinos transgénicos para Bcl-2. Se sabe que esta proteína inhibe la muerte de estas células frente a diversos estímulos apoptóticos; sin embargo, no se presenta una acumulación excesiva de este tipo de células en el animal, esto puede entenderse mejor si se considera que además de inhibir apoptosis, Bcl-2 también bloquea la proliferación celular al impedir la progresión del ciclo celular.

Bcl-2 retarda la entrada al ciclo celular en células que se encuentran inicialmente en un estado G0, como linfocitos T y B antes de su activación (55) y acelera la salida del mismo bajo ciertas circunstancias, esto último se observó en estudios en los que se indujo la

diferenciación de células pertenecientes a la línea celular de leucemia pro-mielocítica HL60, donde Bcl-2 aceleró la salida del ciclo celular hacia G0. En este mismo estudio se observó que la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 es independiente de su capacidad para favorecer la salida del ciclo celular (56). Vale la pena señalar que las células que sobreviven o que ven afectado su ciclo celular por sobre-expresión de Bcl-2 generalmente son sometidas a tratamientos que las afectan de algún modo u otro, como el retiro de IL-3 a células dependientes de esta citocina, exposición de células promielocíticas a agentes inductores de la diferenciación, inducción de G0 por concentraciones bajas de suero o activación antigénica de linfocitos T y B. La sobre-expresión de Bcl-2 en células que estaban continuamente en ciclo celular no afectó la progresión del mismo, aunque existe una excepción que se presenta en la línea celular SW480 de carcinoma de colon, en la cual la sobre-expresión de Bcl-2 no solo retarda la entrada de las células al ciclo celular, sino que bloquea de manera significativa la proliferación celular (55). Estos estudios muestran también que la sobre-expresión de Bcl-2 no conduce a una acumulación de células porque la mayor supervivencia celular se ve compensada por la menor tasa de proliferación al inducir Bcl-2 la detención del ciclo celular. La capacidad de Bcl-2 de detener el ciclo celular puede contribuir a su baja oncogenicidad, de esta manera una célula que sobre-expresa Bcl-2 si bien ve prolongada su supervivencia, también ve reducida su tasa de proliferación (50).

Bax  $\alpha$  parece reducir el efecto de Bcl-2 sobre el ciclo celular (55) y en células que sobre-expresan Bax  $\alpha$ , se ve incrementado el número de células en ciclo celular y se acelera la entrada a la fase S, al menos en timocitos de ratón, en los cuales también se observa una reducción en el número de células en G0/G1 (58).

En ratones que sobre-expresan Bcl-2 se han observado bajos niveles de la proteína cdc2, que es la subunidad catalítica de ciertos complejos ciclinas-cinasas dependientes de ciclinas (ciclina-cdk) y que permite a una célula entrar a la fase S o a la fase M, sin embargo, no se sabe si esto es causa o efecto del arresto del ciclo celular. Cuando células T de ratones transgénicos para Bcl-2 son estimuladas con mitógenos, la proteína Rb permanece en su estado hipofosforilado (55,57), lo que implica que los complejos ciclinas-cdk, algunos de los cuales fosforilan a Rb, permanecen inactivos por un periodo de tiempo prolongado en células transgénicas para Bcl-2, posiblemente debido a la presencia de inhibidores de cdk's como p27 o p16 (59), al estar bloqueados los complejos ciclinas-cdk's, Rb no se fosforila, por lo tanto el factor de transcripción E2F se encuentra secuestrado y no pueden ser transcritos genes necesarios para la iniciación de la fase S (59). En células T sobre-expresando Bcl-2 también se ha observado que los niveles del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p27 permanecen elevados después de la activación cuando en las células normales es degradado durante G1. Por otro lado, la variación en los niveles de otro inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21, no se ve alterada por Bcl-2, estos inhibidores se cree que podrían interconectar eventos de transducción de señales con las cinasas dependientes de ciclinas (cdk) que fosforilan substratos como la proteína Rb. Bcl-2 también parece impedir la traslocación nuclear del factor de transcripción NFAT, mismo que se requiere para la óptima producción de IL-2, citocina que actúa como factor de crecimiento y permite la progresión del ciclo celular al ser indispensable para que una célula T progrese a la fase S (57).

Reportes recientes indican que la región del asa no conservada localizada entre los dominios BH3 y BH4 es la implicada en la regulación del ciclo celular por Bcl-2. Se ha

reportado también que otros miembros de esta familia, como Bcl-xl y E1B19kD retardan la entrada al ciclo celular en ciertas células (55).

Todos estos datos apoyan una relación entre ciclo celular, familia Bcl-2 y apoptosis, posiblemente a través de proteasas que actúan río abajo del punto de acción de Bcl-2 y Bax, las cuales son necesarias tanto para activar otras proteasas con funciones apoptóticas o proteínas tales como p27. La observación de que los niveles de ARNm para bcl-2, bax y bcl-xl se ven incrementados por la presencia de factores de crecimiento (58) sugieren que estas proteínas desempeñan un papel en la progresión del ciclo celular.

## II.7.- RAZÓN BCL-2/BAX

En estudios anteriores realizados en cáncer de vejiga se observó que la razón de expresión bcl-2/bax a nivel de ARNm se relacionaba con la evolución de la enfermedad, encontrándose que una mayor expresión del gen anti-apoptótico (razón mayor que 1.0) se asociaba a un mal pronóstico de la enfermedad, mientras que se encontraba una evolución más favorable para el paciente si había una mayor expresión del gen pro-apoptótico (razón menor que 1.0) (87). Los pacientes con tumores con una mayor expresión de Bcl-2 presentaron mayor frecuencia de recurrencias tempranas, mientras que los pacientes cuyos tumores tenían una mayor expresión de Bax generalmente no presentaban recurrencias.

Al medir el nivel de expresión de Bcl-2 y Bax por inmunohistoquímica en linfomas, los resultados mostraban que los tumores clasificados como indolentes por su resistencia a la quimioterapia, en general presentaban una razón Bcl-2/Bax elevada (razón mayor que 1),

mientras que los linfomas clasificados como agresivos tenían una razón Bcl-2/Bax cercana a cero y respondían rápidamente a la quimioterapia, teniendo una tasa de curación de entre el 30% y el 50% (88).

Midiendo el nivel de expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax por citometría de flujo en células B de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B, se observó que las células de pacientes con enfermedad avanzada que habían sido tratados con clorambucil presentaban una razón Bcl-2/Bax que se situó entre 2.79 y 0.97; en el grupo de pacientes con enfermedad avanzada que no habían sido tratados, la razón Bcl-2/Bax se situó entre 1.05 y 0.22, mientras que las células de los individuos sanos empleados como control presentaban valores entre 0.30 y 0.17. En los individuos enfermos tratados se observó que los mayores valores de la razón Bcl-2/Bax correspondían a pacientes cuyos tumores presentaban también resistencia in vivo e in vitro al clorambucil (89), además, las células B de los individuos control mostraron los más elevados niveles de Bax (89,90).

Otros estudios en los que se determinó el nivel de expresión de Bcl-2 y Bax por Western blot muestran también que una mayor expresión de Bcl-2 se asocia con fármaco-resistencia (91).

El cáncer testicular es uno de los pocos cánceres curables aún cuando se hayan desarrollado metástasis y responde muy bien a la quimioterapia. Este tipo de cáncer presenta una relación Bcl-2/Bax cercana a cero con elevados niveles de Bax y niveles casi indetectables de Bcl-2, además presenta un gen p53 normal, estas características podrían favorecer la apoptosis de las células cancerosas (92).

En el presente trabajo se estudia la expresión de los genes bcl-2 y bax en tejido colorrectal tumoral y tejido colorrectal normal proveniente de pacientes mexicanos. Esta evaluación se realiza a nivel de ARNm y se busca determinar diferencias en la expresión de estos genes entre uno y otro tejido.

### **III.- OBJETIVO**

Determinar semicuantitativamente el grado de expresión de los genes bcl-2 y bax a nivel de ARNm en muestras de tumores colorrectales y sus respectivos controles, obtenidas de pacientes mexicanos, a fin de detectar posibles diferencias en la expresión de estos genes entre tejido tumoral y tejido normal.

### **IV.- HIPÓTESIS**

bcl-2 y bax participan en funciones anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. La sobreexpresión de uno de estos genes puede favorecer la sobrevivencia (bcl-2) o la muerte celular (bax), de acuerdo a lo reportado en la literatura.

En el caso de tejidos tumorales avanzados podría esperarse preferencialmente sobreexpresión de bcl-2 sobre bax, que es un gen anti-apoptótico. Además, dada la existencia de transcritos alternativos para estos genes, es posible que se presenten bandas adicionales a las esperadas una vez realizada la electroforesis de ADN.

### **III.- OBJETIVO**

Determinar semicuantitativamente el grado de expresión de los genes bcl-2 y bax a nivel de ARNm en muestras de tumores colorrectales y sus respectivos controles, obtenidas de pacientes mexicanos, a fin de detectar posibles diferencias en la expresión de estos genes entre tejido tumoral y tejido normal.

### **IV.- HIPÓTESIS**

bcl-2 y bax participan en funciones anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. La sobre-expresión de uno de estos genes puede favorecer la sobrevivencia (bcl-2) o la muerte celular (bax), de acuerdo a lo reportado en la literatura.

En el caso de tejidos tumorales avanzados podría esperarse preferencialmente sobre-expresión de bcl-2 sobre bax, que es un gen anti-apoptótico. Además, dada la existencia de transcritos alternativos para estos genes, es posible que se presenten bandas adicionales a las esperadas una vez realizada la electroforesis de ADN.

## V.- METODOLOGÍA

### V.1.- EXTRACCIÓN DEL ARN:

Antes de proceder a explicar cada una de las etapas, se mencionará que el ARN es degradado por enzimas denominadas RNAsas o ribonucleasas, las cuales son ubicuas y generalmente no requieren de cofactores, debido a ello todo el material que se emplea es material de vidrio estéril, material de plástico desechable y soluciones tratadas con dietilpírocarbonato (DEPC), que es un inhibidor de estas enzimas (42).

#### V.1.1.- Extracción del ARN total:

##### **Material:**

1 Termo  
1 Pinzas de disección  
1 mortero con pistilo  
Tubos de ensayo estériles  
Tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles  
Tubos Eppendorf de 0.5 mL estériles  
Micropipeta de 1 mL  
Micropipeta de 200 µL  
Micropipeta de 20 µL  
Puntas para micropipeta estériles  
Baño de hielo  
Gasas estériles

##### **Equipo:**

Homogeneizador de tejido  
Vórtex  
Centrífuga refrigerada  
Desecador

##### **Reactivos:**

Nitrógeno líquido  
Trizol  
Cloroformo  
Isopropanol  
Etanol al 75% libre de  
ribonucleasas \*

---

\* Ver en Apéndice composición y preparación

La extracción del ARN se hace por la técnica del Trizol (Life Technologies), éste reactivo permite extraer selectivamente el ARN total con un alto rendimiento. El proceso que se sigue es (42):

- 1.- Se prepara el homogeneizador de tejido, lavándolo inicialmente con agua desionizada no estéril, después con etanol al 75% libre de ribonucleasas y finalmente se enjuaga con Trizol.
- 2.- Se coloca 1 mL de Trizol en los tubos de ensayo que vayan a utilizarse, manteniéndolos en baño de hielo, cada uno junto a un tubo Eppendorf debidamente etiquetado.
- 3.- Preparado el material se saca el tejido del nitrógeno líquido, colectando un poco del nitrógeno y colocando en él el recipiente que contiene al tejido.
- 4.- El tejido se coloca en el mortero, este paso debe realizarse lo más rápidamente posible para evitar el descongelamiento de la muestra y la posible degradación del ARN debido a la activación de las ribonucleasas endógenas.
- 5.- Una vez en el mortero, se mantiene congelada la muestra de tejido agregando de manera continua nitrógeno líquido sobre ella, simultáneamente se empieza a triturar con el pistilo.
- 6.- Ya triturada, se ponen alrededor de 50-100 mg de tejido en cada tubo de ensayo que contenga 1 mL de Trizol y se homogeneiza.

7.- El homogeneizado se transfiere a un tubo Eppendorf limpio y estéril y se deja reposar por 5 minutos para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteína.

8.- Posteriormente se adicionan 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de Trizol empleado, se cierra el tubo perfectamente bien y se agita en vórtex por 15 segundos, después de ello se deja reposar por 2-3 minutos en baño de hielo.

9.- Se centrifuga a 12,000 g a 4°C por 15 minutos.

10.- Después de la centrifugación, el homogeneizado se separa en dos fases, la fase superior, que es la acuosa y la que contiene al ARN se transfiere a un tubo Eppendorf limpio y estéril.

11.- Se adicionan al tubo que contiene la fase acuosa 0.5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol empleado en la homogeneización, esto se hace para precipitar al ARN.

12.- Se mezcla y se deja reposar la muestra por 5-10 minutos.

13.- Se centrifuga a 12,000 g como máximo por 10 minutos a 4°C. Al final de la centrifugación se debe observar un pequeño botón blanco en el fondo del tubo.

14.- Se elimina el sobrenadante y el botón de ARN se lava con etanol al 75% libre de ribonucleasas, adicionando al menos 1 mL de etanol al 75% por cada mililitro de Trizol empleado en la homogeneización y agitando con vórtex.

15.- Posteriormente el tubo de lavado se centrifuga a 7,500 g como máximo por 5 minutos a 4°C.

16.- Una vez lavado, se elimina el sobrenadante y el botón (o pellet) se deja secar brevemente al aire (impidiendo una posible contaminación por ribonucleasas). No debe dejarse secar totalmente porque se reduce en gran medida su solubilidad.

17.- El ARN así obtenido se redisuelve en agua inyectable en un volumen de 15 a 45 µL dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida. Puede usarse el vórtex o pipetarse varias veces para acelerar la disolución. En algunos casos puede requerirse de una incubación de 10 a 15 minutos a 55-60°C para disolver las muestras de ARN.

#### **V.1.2.- Determinación de la pureza, concentración e integridad del ARN obtenido:**

##### **Material:**

Micropipeta de 1 mL

Micropipeta de 200 µL

Micropipeta de 20 µL

Puntas para micropipeta estériles

Piseta

Cámara de electroforesis

Matraz Erlenmeyer de 250 mL

Matraz Erlenmeyer de 500 mL

##### **Reactivos:**

Amortiguador de corrida (MOPS)\*

Amortiguador de carga para ARN\*

Agarosa

Formaldehído

Solución de bromuro de etidio\*

##### **Equipo:**

Espectrofotómetro

---

\* Ver en Apéndice composición y preparación.

Espátula	Celdas de cuarzo
Probeta	Fuente de poder
Flotadores	Balanza
	Horno de microondas
	Baño de agua a 65°C
	Baño de hielo
	Centrífuga para tubos Eppendorf
	Transiluminador
	Lentes de seguridad

Una vez que se tiene la suspensión de ARN se realiza lo siguiente (42):

1.- Inicialmente se determina la pureza del ARN obtenido, esto se hace obteniendo las lecturas a 260 nm y a 280 nm, el cociente  $A_{260}/A_{280}$  debe ser al menos de 1.8, si es menor puede deberse a una contaminación por proteínas o por fenol y no será posible realizar una cuantificación exacta del ARN obtenido. Si el valor es menor de 1.6 la muestra debe ser reextraída nuevamente con trizol. La concentración se calcula considerando que una lectura de absorbancia de 1.000 corresponde a 40  $\mu\text{g}$  de ARN por mL.

Antes de leer en el espectrofotómetro, la muestra se diluye 1:250, tomando por ejemplo 2  $\mu\text{L}$  y llevándolos a 500  $\mu\text{L}$ . Para calcular su concentración se toma en cuenta el factor de dilución, la lectura a 260 nm y, como ya se mencionó, que una lectura de absorbancia igual a 1.000 corresponde a aproximadamente 40  $\mu\text{g}$  de ARN por mL (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (42). A continuación se presenta un ejemplo de cómo se calculó la concentración:

Datos:

Dilución de la muestra: 1:250

Volumen tomado de la muestra: 2  $\mu\text{L}$

Volumen final de la muestra: 500  $\mu\text{L}$

Una lectura de Absorbancia de 1.000 equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN.

Inicialmente se determina qué concentración corresponde a la lectura de absorbancia que se obtuvo a 260 nm, que es la lectura correspondiente a los ácidos nucleicos:

$$i \mu\text{g}/\text{mL} = (0.749)([40 \mu\text{g}/\text{mL}]/1.000)$$

$$i \mu\text{g}/\text{mL} = 29.96 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Después se determinó la cantidad total de ARN que se tenía en la dilución, cuyo volumen total era de 500  $\mu\text{L}$ :

$$i \mu\text{g} = 500 \mu\text{L} (29.96 \mu\text{g}/1000 \mu\text{L})$$

$$i \mu\text{g} = 14.98 \mu\text{g}$$

Tomando en cuenta que esa cantidad estaba contenida originalmente en los dos  $\mu\text{L}$  de muestra que se tomaron para hacer la dilución, se calculó entonces cuántos  $\mu\text{g}$  de ARN se tendrían en la solución de ARN original:

$$i \mu\text{g} = 1 \mu\text{L} (14.98 \mu\text{g}/2 \mu\text{L})$$

$$i \mu\text{g} = 7.49 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

La pureza y concentración se determina por triplicado para cada muestra.

Si la pureza es la adecuada se procede a determinar la integridad del ARN.

La integridad se evalúa mediante una electroforesis (42). Para realizarla se requiere de:

- \*Un amortiguador de corrida (MOPS)
- \*Un amortiguador de carga para ARN
- \*Gel de agarosa conteniendo formaldehído
- \*Preparación de la muestra

La electroforesis se realiza sumergiendo el gel en una solución buffer o solución amortiguadora que confiera la fuerza iónica adecuada, además se necesita una solución amortiguadora que permita cargar la muestra en el gel, esta solución recibe el nombre de buffer de carga.

El amortiguador de corrida para ARN puede adquirir un color amarillento si se expone a la luz o si se esteriliza en autoclave. El buffer amarillo paja puede trabajar bien, pero el más oscurecido no lo hará.

El amortiguador de carga confiere las siguientes características a la muestra(42):

- Incrementa la densidad de la muestra asegurando que la gota permanezca en el pocillo del gel.
- Agrega un color a la muestra, simplificando el proceso de carga y permitiendo el monitoreo del avance de la electroforesis.

Para realizar la electroforesis del ARN se preparan geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído, además, la muestra se prepara antes de cargarla en el gel. A continuación se indica la composición del gel (42):

Agarosa	1%
Formaldehído 12.3 M	17%
Amortiguador de corrida 5X	20%
Agua libre de RNAsas	62%

El grosor del gel de preferencia no debe ser mayor a 0.5 cm.

Para prepararlo se sigue el siguiente procedimiento:

Inicialmente se prepara la cámara de electroforesis de la siguiente manera:

a) Se lava escrupulosamente con una solución detergente no muy concentrada, enjuagando con abundante agua.

b) Se enjuaga con agua destilada.

c) Se enjuaga con agua tratada con DEPC.

d) La superficie sobre la que se va a moldear el gel se limpia perfectamente bien con etanol.

e) El peine se ajusta para que quede a la altura deseada (no debe tocar la superficie sobre la que se va a moldear el gel, debe haber un espacio de aproximadamente 2 mm entre la superficie y el peine).

Una vez preparada la cámara se hace lo siguiente:

1.- Se adiciona la cantidad necesaria de agarosa en un matraz Erlenmeyer de volumen adecuado.

2.- Se adiciona la cantidad necesaria de agua tratada con DEPC y se le pone al matraz un tapón para evitar la evaporación excesiva de agua.

3.- Se pesa el matraz conteniendo el agua y la agarosa para conocer la cantidad de agua que se pierde por evaporación.

4.- Se lleva a la campana el formaldehído y la cantidad de amortiguador de corrida 5X que vaya a requerirse.

5.- Se prepara la superficie sobre la que se va a verter el gel, colocándola sobre papel y en una superficie lisa.

6.- Se calienta el matraz que contiene el agua y la agarosa por un tiempo adecuado, cuidando de que el líquido no hierva demasiado como para que toque el tapón.

7.- Una vez calentado el tiempo suficiente, se verifica rápidamente que la agarosa este totalmente disuelta y que la solución no presente partículas extrañas.

8.- Rápidamente se pesa el matraz determinando la cantidad de agua que perdió por evaporación y reponiéndola.

9.- Se lleva a la campana, dejando enfriar el contenido del matraz a 60°C aproximadamente y entonces se adiciona el volumen necesario de buffer de corrida 5X y se mezcla.

10.- Se adiciona el volumen necesario de formaldehído y se mezcla.

11.- Rápidamente se moldea el gel sobre la superficie a utilizar.

12.- Se deja solidificar en la campana de extracción por al menos 30 minutos, a temperatura ambiente, protegiéndolo del polvo u otra posible fuente de ribonucleasas.

**PRECAUCIÓN:** El formaldehído es volátil, irritante y es un potente mutágeno. El formaldehído deberá trabajarse en la campana. El bromuro de etidio es un potente agente mutagénico y deberá evitarse todo contacto con él.

Mientras se solidifica el gel se prepara la muestra, esto se hace de la siguiente manera (42):

1.- Se mezcla lo siguiente en un tubo Eppendorf:

- |  |                    |
|--|--------------------|
| - Solución conteniendo el ARN (arriba de 3 $\mu\text{g}$ ) | el vol. necesario  |
| - Amortiguador de corrida 5X (MOPS)                        | 2.0 $\mu\text{L}$  |
| - Formaldehído   | 3.5 $\mu\text{L}$  |
| - Formamida  | 10.0 $\mu\text{L}$ |

2.- La mezcla se incuba por 15 minutos a 65°C y pasado este tiempo se enfría en hielo.

3.- Se centrifuga el tubo por 5 segundos para depositar el fluido en el fondo del mismo.

4.- Se adicionan 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga para ARN.

5.- Se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de solución de bromuro de etidio.

6.- Se mezcla.

Solidificado el gel y preparada la muestra, se procede a efectuar la electroforesis, para ello lo que se hace es:

1.- Se prepara la cantidad necesaria de amortiguador de corrida 1X para ARN.

2.- Se llena la cámara de electroforesis.

3.- Se sumerge el gel.

4.- Se cargan las muestras.

5.- Se corre a 60 V hasta que el frente de colorante haya avanzado 3/4 de la longitud total del gel.

6.- Se corta la corriente eléctrica, se extrae cuidadosamente el gel y se observa en el transiluminador, protegiéndose el observador de la radiación ultravioleta. Si el ARN está íntegro, deberán observarse claramente dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S.

## V.2.- RT-PCR

### V.2.1.- Reacción de la transcriptasa inversa (46).

Material:	Equipo
Micropipeta de 200 $\mu$ L	Termociclador (Perkin Elmer 2400)
Micropipeta de 20 $\mu$ L	Baño de hielo
Puntas para micropipeta estériles	Campana de flujo laminar
Guantes de látex	
Tubos para PCR	

#### Reactivos:

Enzima M-MLVRT 200 U/ $\mu$ L (Life Technologies)

Ditiotreitol (DTT, 0.1M, Life Technologies)

Amortiguador de reacción 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) (Life Technologies)

DNTPs 10 mM (Perkin Elmer)

Oligo(dT) 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L (Life Technologies)

Agua inyectable (USV Grossman)

Solución con ARN (1  $\mu$ g/ $\mu$ L)

Se preparan inicialmente diluciones de los ARN a analizar con una concentración aproximada de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La reacción se lleva a cabo en un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$ , mezclándose los reactivos en el siguiente orden y en las cantidades indicadas:

Agua inyectable	7 $\mu\text{L}$
Amortiguador 5X	4 $\mu\text{L}$
DTT	2 $\mu\text{L}$
dNTPs	1 $\mu\text{L}$ de c/u
Oligo(dT)	1 $\mu\text{L}$
ARN	1 $\mu\text{L}$
M-MLVRT	1 $\mu\text{L}$

Para reducir la posibilidad de contaminación, esto se hace en la campana de flujo laminar, empleando tubos de PCR, guantes y cubrebocas, la enzima se saca del congelador en el momento preciso en el que se vaya a utilizar (46):

Las concentraciones de los diferentes componentes en la mezcla de reacción se indican a continuación:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Amortiguador (Tris-HCl, KCl, $\text{MgCl}_2$ )	1X (50 mM, 75 mM, 3 mM respectivamente)
DTT	10 mM
dNTPs	500 $\mu\text{M}$ c/u
oligo(dT)	10 $\text{ng}/\mu\text{L}$
Enzima M-MLVRT	200 U
ARN	50 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Se debe incluir un control negativo, el cual consistirá en un tubo que llevará todos los componentes excepto el ARN.

Una vez hecha la mezcla de reacción, ésta se incuba a 37°C por una hora en el termociclador. Pasado ese tiempo, se enfría en hielo y está lista para emplearse en la reacción de PCR.

### **V.2.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):**

#### **Material:**

Micropipeta de 200 µL

Micropipeta de 20 µL

Puntas para micropipeta estériles

Guantes de látex

Tubos para PCR

#### **Equipo:**

Termociclador (Perkin Elmer)

Baño de hielo

Campana de flujo laminar

#### **Reactivos:**

Taq polimerasa 5 U/µL (Biotecsa SA de CV)

Agua inyectable (UV Grossman)

Amortiguador de reacción con Mg<sup>2+</sup> 10x (Bioselec)

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) 10 mM (Perkin Elmer)

Oligonucleótidos 10 µM

Muestra con cDNA

Los genes con los que se trabajó son bcl-2, bax y  $\beta$ -2-microglobulina, éste ultimo, al ser un gen de expresión constitutiva, se utilizó como control de expresión. La secuencia de los oligonucleótidos específicos de cada uno de ellos se presenta en la tabla 3.

**TABLA 3: SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES BCL-2, BAX Y  $\beta$ 2M**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia
bcl-2	Con sentido	5'-GTG GAG GAG CTC TTC AGG GA-3'
	Antisentido	5'-AGG CAC CCA GGG TGA TGC AA-3'
$\beta$ 2m	Con sentido	5'-TTA GCT GTG CTC GCG CTA CTC TCT C-3'
	Antisentido	5'-GTC GGA TTG ATG AAA CCC AGA CAC A-3'
bax	Con sentido	5'-GGC CCA CCA GCT CTG AGC AGA-3'
	Antisentido	5'-GCC ACG TGG GCG TCC CAA AGT-3'

El procedimiento que se sigue para realizar una reacción de PCR es el siguiente (46):

Preparación de la mezcla de reacción.

Se debe trabajar en una zona limpia libre de corrientes de aire, con guantes y cubreboca, de preferencia en una campana de flujo laminar, todo el material utilizado debe estar limpio y estéril, los reactivos deben mantenerse en un baño de hielo.

Inicialmente se prepara un mezcla o cóctel con las cantidades de reactivos necesarias para el número de muestras a correr, el cual contendrá todo menos el ADN a

amplificar. Se sugiere preparar un ligero exceso de este cóctel. El volumen de cada reacción será de 50  $\mu\text{L}$ .

Las concentraciones a utilizar de los diferentes componentes son:

$\text{Mg}^{+2}$  : 1.5 mM

Amortiguador de reacción: 1X

dNTPs: 200 $\mu\text{M}$

Oligonucleótidos: 1  $\mu\text{M}$

Solución con cDNA producto de la RT: 5  $\mu\text{L}$

Taq pol: 1.25 U

Los componentes de una mezcla de reacción se mezclan en un tubo Eppendorf en el siguiente orden y cantidades.

1.- Agua inyectable estéril	26 $\mu\text{L}$
2.- Amortiguador de reacción	3.75 $\mu\text{L}$
3.- dNTPs	4 $\mu\text{L}$ (1 $\mu\text{L}$ de c/u)
4.- Oligonucleótido sense	5 $\mu\text{L}$
5.- Oligonucleótido antisense	5 $\mu\text{L}$
6.- Taq pol	1.25 $\mu\text{L}$
7.- Se mezcla suavemente	

Esta cantidad puede ser multiplicado por 2, 3 o cualquier otro factor dependiendo del número de reacciones de 50  $\mu\text{L}$  que se vayan a correr.

Preparada esta mezcla se procede a distribuirla en tubos especiales para PCR de acuerdo al volumen de reacción que se tenga planeado utilizar, en este caso, puesto que se emplearán 50  $\mu\text{l}$  por reacción, se colocan 45  $\mu\text{l}$  de esta mezcla en cada tubo.

Posteriormente, se agrega el cDNA de la muestra biológica en la cantidad adecuada, en este caso se agregan 5  $\mu$ L del producto de RT.

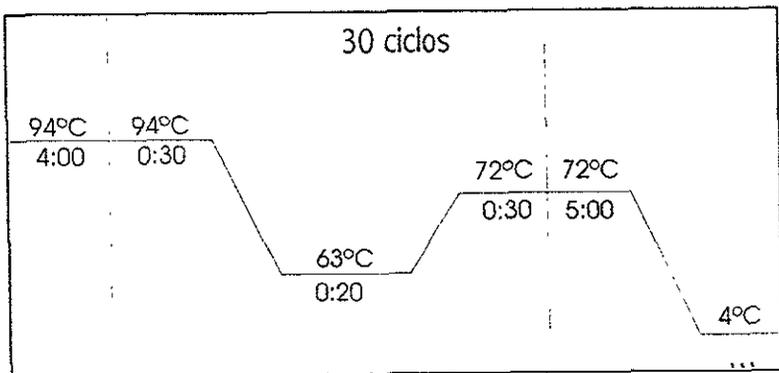
La Taq pol se deberá conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  el mayor tiempo posible, sacándola del congelador en el momento preciso en que vaya a utilizarse.

Generalmente se prepara un ligero exceso de la mezcla para garantizar que no falte volumen. A uno de los tubos no se le adiciona ADN, en vez de ello se le agregará agua estéril y servirá como control negativo.

Ya preparados los tubos de PCR se colocan en el termociclador, aplicando el programa de temperaturas que se manejen para el gen en cuestión.

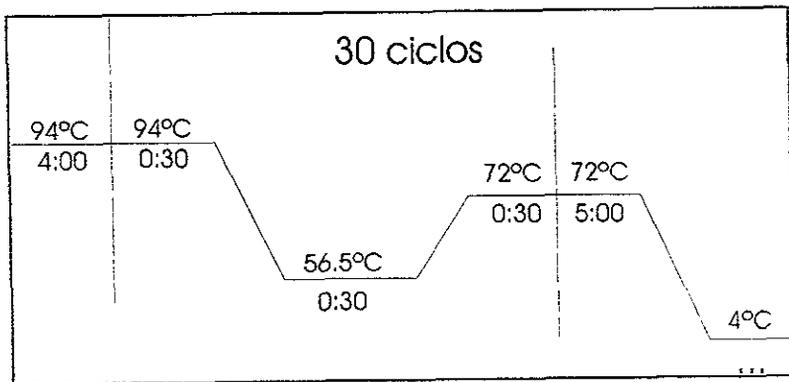
Para el caso de los genes Bax y B-2-microglobulina, el programa de PCR a emplear es:

Temperatura inicial de desnaturalización:	94°C
Tiempo inicial de desnaturalización:	4 min
Temperatura de desnaturalización:	94°C
Tiempo de desnaturalización:	30 seg
Temperatura de alineación:	63°C
Tiempo de alineación:	20 seg
Temperatura de polimerización:	72°C
Tiempo de polimerización:	30 seg
Tiempo adicional de polimerización:	5 min
# de ciclos:	30



Para el gen Bcl-2, el programa a emplear es:

Temperatura inicial de desnaturalización:	94°C
Tiempo inicial de desnaturalización:	4 min
Temperatura de desnaturalización:	94°C
Tiempo de desnaturalización:	30 seg
Temperatura de alineación:	56.5°C
Tiempo de alineación:	30 seg
Temperatura de polimerización:	72°C
Tiempo de polimerización:	30 seg
Tiempo adicional de polimerización:	5 min
# de ciclos:	30



Después de este tiempo, se extraen los tubos y se colocan en baño de hielo por 10 minutos, se centrifugan para depositar el líquido en el fondo del tubo.

### V.2.3.- Electroforesis del Producto de la Reacción de PCR:

#### Material:

Espátula

Cámara de electroforesis

Micropipeta de 200  $\mu$ L

Micropipeta de 20  $\mu$ L

Matraz Erlenmeyer de 250 mL

Matraz Erlenmeyer de 500 mL

#### Reactivos:

Amortiguador de corrida para ADN\*

Amortiguador de carga para ADN 6X\*

Solución de Bromuro de etidio\*

Marcador de pesos moleculares

Agarosa

#### Equipo

Fuente de poder

Balanza

Horno de microondas

Transiluminador.

Se cargaron en los geles 10  $\mu$ L de cada muestra. Del producto de la reacción de PCR se toman 10  $\mu$ L y se mezclan con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X para ADN. Se mezcla y de aquí se toman 10  $\mu$ L para cargar el gel.

Para comprobar que los fragmentos obtenidos son del tamaño esperado se utiliza un marcador de 50 pb. El marcador de pesos moleculares se prepara de la siguiente manera:

Marcador de pesos moleculares:

1  $\mu$ L

---

\* Ver en el apéndice componentes y forma de preparación

\* Ver en el apéndice componentes y forma de preparación

Amortiguador de carga para ADN	2 $\mu$ L
Agua inyectable	3 $\mu$ L

Se prepara un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio y solución buffer de TBE para realizar la electroforesis (42).

El gel se prepara de la siguiente manera:

1.- Inicialmente se prepara un litro de buffer de corrida para ADN con una concentración 0.5X.

2.- En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocan 2.0 g de agarosa y 100 mL de amortiguador de corrida 0.5X para ADN.

3.- Se pesa el matraz conteniendo la agarosa y el buffer 0.5X.

4.- Se calienta hasta la disolución total de la agarosa.

5.- Se repone el agua perdida por evaporación.

6.- Se deja enfriar a una temperatura tal que se soporte el contacto del matraz con el dorso de la mano y entonces se le agregan 4  $\mu$ L de la solución de bromuro de etidio y se mezcla perfectamente.

7.- Se vierte el líquido sobre el molde y se deja solidificar por al menos media hora. De preferencia el grosor del gel no debe ser mayor a 0.5 cm.

Preparado el gel, se llena la cámara de electroforesis con buffer de corrida 0.5X, se sumerge el gel y se cargan las muestras. Se corre el gel a 80 V hasta que el frente del colorante haya avanzado 3/4 partes del gel (42).

Después de ello se observa el gel en el transiluminador observando la intensidad de las bandas buscadas, la presencia o ausencia de amplificación inespecífica y la ausencia de contaminación y degradación.

Después de realizar la electroforesis, al gel se le toma una fotografía con una cámara Polaroid modelo DS34 y empleando un rollo fotográfico Polaroid modelo 665. El negativo de la fotografía se utiliza para medir la intensidad de cada banda por densitometría (43).

### **V.2.3.- Densitometría**

Las lecturas densitométricas se realizaron utilizando el programa "Collage" versión 3.0, capturando las imágenes de los negativos fotográficos, correspondientes a las diferentes electroforesis, con ayuda de un digitalizador de imágenes y de una computadora personal. Las lecturas reportadas para cada banda están dadas en unidades arbitrarias que el programa asigna.

## VI.- RESULTADOS:

**Datos clínicos de los pacientes.-** Se analizaron 10 muestras tumorales y sus respectivos controles de tejido normal. A cada muestra se le asignaron números consecutivos del 1 al 10. A continuación se presentan los datos clínicos de los pacientes estudiados (tabla 4) indicándose la edad, sexo, etapa en la que se encontraba el tumor y el tipo de cáncer que presentaban:

**TABLA 4.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y DE LOS RESPECTIVOS TUMORES ESTUDIADOS.**

# de muestra	Edad (años)	Sexo	Etapa del tumor*	Tipo de cáncer	Metástasis
1	87	F	ND	Esporádico	Si (hepática)
2	75	F	T2N0M0 (Dukes' B1)	Esporádico	No
3	31	F	NA	PAF**	NA
4	69	M	T3N0M0 (Dukes' B2)	Esporádico	No
5	55	F	T3N1M0 (Dukes' C2)	Esporádico	No
6	60	F	T3N0M0 (Dukes' B2)	Esporádico	No
7	80	M	T3N0M0 (Dukes' B2)	Esporádico	No
8	88	M	T2N0M0 (Dukes' B1)	Esporádico	No
9	33	F	NA	PAF**	NA
10	31	M	T3N3M1 (Dukes' D)	Esporádico	Si (pulmón)

F: Femenino; M: masculino; ND: No determinada; NA: No Aplicable;

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar;

\*Ver "Estadificación y Pronóstico", página 20.

\*\* La afección no progresó a cáncer, se realizó cirugía preventiva.

**Integridad y pureza de las muestras de ARN total.-** Las soluciones de ARN de los tumores y sus respectivos controles se diluyeron 250 veces y se analizaron en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Los resultados de absorbancia a las diferentes longitudes de onda, la relación  $A_{260}/A_{280}$  y la concentración de las muestras, analizada cada una por triplicado, se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5, continuación...**

T9*	1.343	0.763	1.8	13.43	25.35
	1.297	0.735	1.8	12.97	
	1.163	0.662	1.8	11.63	
C9	0.976	0.539	1.8	9.76	10.46
	1.103	0.614	1.8	11.03	
	1.058	0.579	1.8	10.58	
T10	2.256	1.288	1.8	22.56	22.39
	2.234	1.255	1.8	22.34	
	2.228	1.224	1.8	22.28	
C10	0.115	0.049	2.3	1.15	1.35
	0.151	0.073	2.1	1.51	
	0.138	0.064	2.2	1.38	

T: Muestras tumorales; C: muestras control.

\* Dilución 1:500

♦ Sólo dos lecturas debido a escasez de muestra

Las muestras tumorales están representadas por la letra T seguida del número de muestra y los controles de tejido control indicados con la letra C y el número de muestra correspondiente

Si bien la relación  $A_{260}/A_{280}$  en muchos casos no es mayor a 1.8, en ningún caso es menor a 1.6. Por lo anterior se consideró que la pureza que presentaban las muestras era adecuada para llevar a cabo la reacción de la transcriptasa inversa y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa para la evaluación de la expresión de los genes de interés en el presente estudio. Una vez obtenido un grado de pureza aceptable se procedió a determinar la integridad del ARN obtenido mediante una electroforesis (figura 1).

Como se muestra en la electroforesis del ARN total de tejidos tumorales y controles (figura 1) se observan las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales 28S, 18S y 5S, lo cual demuestra su integridad. Sólo en el caso de la muestra C2 la integridad no fue satisfactoria (carril 2, figura 1A). Posteriormente, se procedió a realizar las diluciones

necesarias del ARN, para obtener finalmente soluciones con una concentración aproximada de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Estas diluciones se emplearon para llevar a cabo la reacción de la transcriptasa reversa (RT) y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En las figuras 2, 3, 4 y 5 y tablas 6, 7, 8, 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de la expresión de los genes *bcl-2*, *bax* y  $\beta 2\text{m}$ , así como los resultados densitométricos de cada uno de los tumores y de los respectivos controles normales.

Los carriles 3, 9 y 15 de la figura 4 corresponden al control C2. A pesar de que su calidad no era del todo aceptable (figura 1), se puede observar que la señal para la expresión de  $\beta 2\text{m}$  es clara (carril 15, fig. 4).

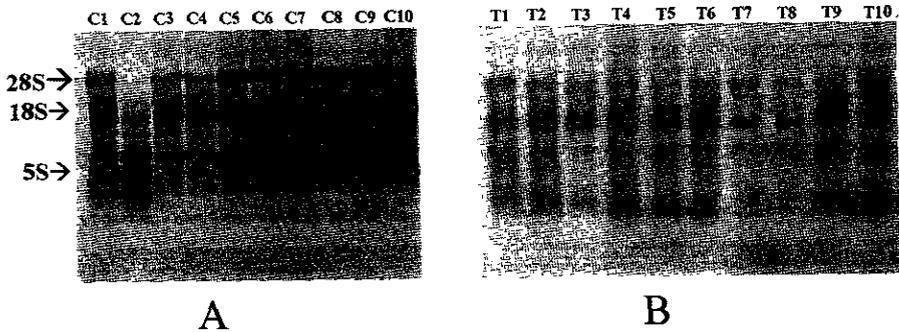


Figura 1: Evaluación de la integridad de las muestras de ARN extraído correspondientes a las muestras de tejido de los pacientes 1 a 10.

A: Electroforesis de las muestras de ARN extraído de los tejidos control (C1 a C10).

B: Electroforesis de las muestras de ARN extraído de tejidos tumorales (T1 a T10).  
El número indica el respectivo paciente.

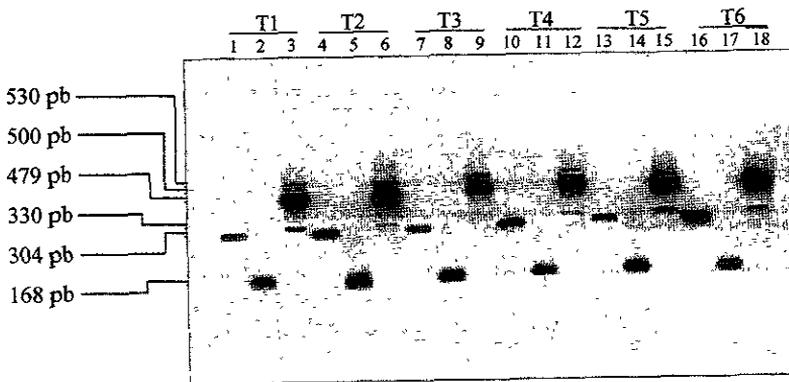


Fig. 2.-Electroforesis correspondiente a las ampliaciones de los cDNA para bcl-2,  $\beta$ 2m y bax (en ese orden). Los productos de amplificación que se corrieron en este gel corresponden a las muestras tumorales T1 a T6. En la parte superior se indican las muestras y los carriles correspondientes.

TABLA 6.- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BCL-2, BAX Y  $\beta$ 2M EN TUMORES COLORRECTALES, MUESTRAS T1 A T6, MEDIDA A PARTIR DE LA AMPLIFICACIÓN DE ARNm POR RT-PCR. LOS DATOS CORRESPONDEN A LA FIGURA 2.

Carril / Muestra	Gen	Lecturas densitométricas (unidades arbitrarias)
1 / T1	Bcl-2	23061
2 / T1	$\beta$ 2m	135741
3 / T1	bax	349652
4 / T2	bcl-2	219486
5 / T2	$\beta$ 2m	271384
6 / T2	bax	521164
7 / T3	bcl-2	35785
8 / T3	$\beta$ 2m	236211
9 / T3	bax	275108
10 / T4	bcl-2	246489
11 / T4	$\beta$ 2m	83202
12 / T4	bax	404504
13 / T5	bcl-2	45521
14 / T5	$\beta$ 2m	223786
15 / T5	bax	523736
16 / T6	bcl-2	291272
17 / T6	$\beta$ 2m	220666
18 / T6	bax	573036

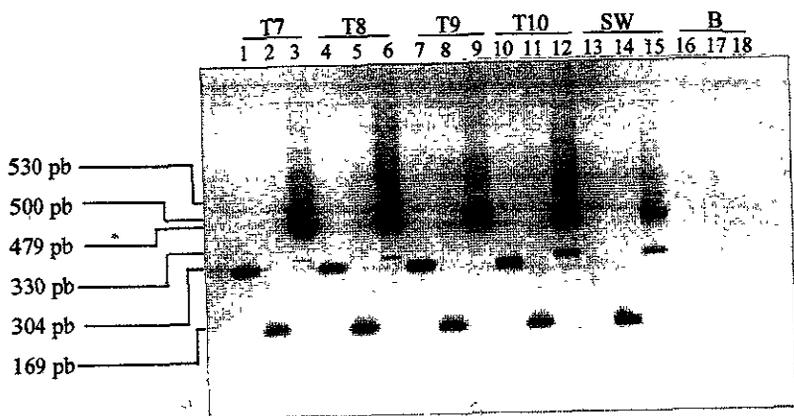


Figura 3.- Electroforesis correspondiente a las ampliificaciones de los cDNA para bcl-2,  $\beta$ 2m y bax (en ese orden). Los productos de amplificación que se corrieron en este gel corresponden a las muestras tumorales T7 a T10. En la parte superior se indican las muestras y los carriles correspondientes. También se evaluó la expresión de estos genes en la línea celular SW620 (SW) y se incluyeron los controles negativos de la reacción de PCR (B).

TABLA 7.- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES bcl-2,  $\beta$ 2M Y BAX EN TUMORES COLORRECTALES, MUESTRAS T7 A T10, MEDIDA A PARTIR DE LA AMPLIFICACIÓN DE ARNm POR RT-PCR. LOS DATOS CORRESPONDEN A LA FIGURA 3.

Carril / Muestra	Gen	Lecturas densitométricas (unidades arbitrarias)
1 / T7	bcl-2	35599
2 / T7	$\beta$ 2m	87804
3 / T7	bax	134240
4 / T8	bcl-2	25924
5 / T8	$\beta$ 2m	134823
6 / T8	bax	153070
7 / T9	bcl-2	155710
8 / T9	$\beta$ 2m	114024
9 / T9	bax	142587
10 / T10	bcl-2	121458
11 / T10	$\beta$ 2m	100036
12 / T10	bax	157804
13 / SW	bcl-2	-----*
14 / SW	$\beta$ 2m	239824
15 / SW	bax	23910
16 / B (control PCR)	bcl-2	
17 / B (Control PCR)	$\beta$ 2m	
18 / B (Control PCR)	bax	

\*No se detectó expresión de bcl-2

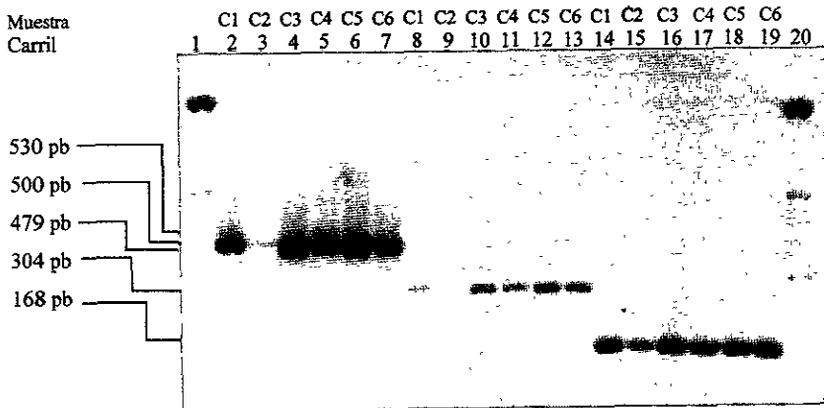


Figura 4.- Electroforesis correspondiente a las amplificaciones de los cDNA de los tejidos normales, muestras C1 a C6. Las primeras seis muestras corresponden a bax, le sigue bcl-2 y finalmente la  $\beta 2m$ . En la parte superior de la figura se indican las muestras y los carriles correspondientes.

**TABLA 8.- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BAX, BCL-2 Y  $\beta 2M$  EN MUESTRAS DE TEJIDO CONTROL MEDIDA A PARTIR DE LA AMPLIFICACIÓN DE ARNM POR RT-PCR. LOS DATOS CORRESPONDEN A LA FIGURA 4.**

Carril / Muestra	Gen	Lecturas Densitométricas (unidades arbitrarias)
1 / MPM 50 pb		
2 / C1	Bax	388600*
3 / C2	Bax	23856*
4 / C3	Bax	509648
5 / C4	Bax	316378
6 / C5	Bax	511335
7 / C6	Bax	297712
8 / C1	Bcl-2	72252*
9 / C2	Bcl-2	8028*
10 / C3	Bcl-2	134572
11 / C4	Bcl-2	77212
12 / C5	Bcl-2	231721
13 / C6	Bcl-2	178413
14 / C1	$\beta 2m$	411162*
15 / C2	$\beta 2m$	183952*
16 / C3	$\beta 2m$	331688
17 / C4	$\beta 2m$	217612
18 / C5	$\beta 2m$	297393
19 / C6	$\beta 2m$	341181
20 / MPM 50 pb		

\*Lecturas a mayor sensibilidad.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

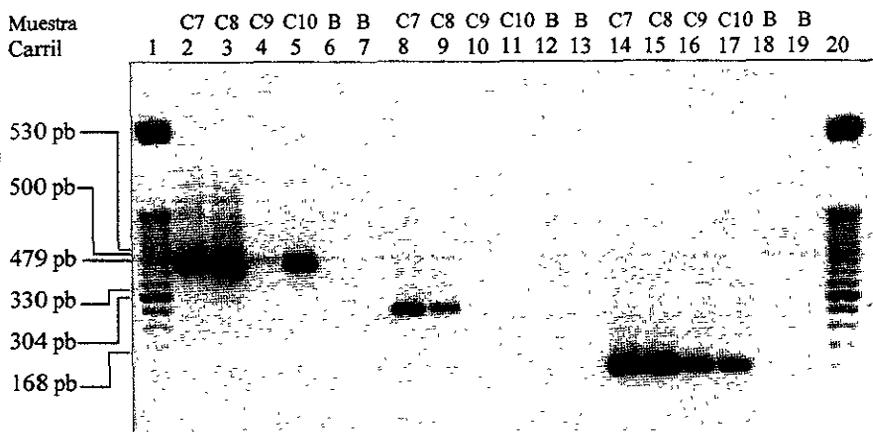


Figura 5.- Electroforesis correspondiente a las ampliaciones de los cDNA de los tejidos normales, muestras C7 a C10. Las primeras muestras corresponden a bax, le sigue bcl-2 y finalmente la  $\beta 2m$ . En la parte superior de la figura se indican las muestras y los carriles correspondientes. Se incluyen los controles de RT y de PCR (B).

TABLA 9.- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BAX, BCL-2 Y  $\beta 2m$  EN TEJIDO CONTROL, MUESTRAS C7 A C10, MEDIDA A PARTIR DE LA AMPLIFICACIÓN DE ARNm POR RT-PCR. LOS DATOS CORRESPONDEN A LA FIGURA 5.

Carril / Muestra	Gen	Lecturas densitométricas (unidades arbitrarias)
1 / MPM 50 pb		
2 / C7	bax	76272
3 / C8	bax	198479
4 / C9	bax	17998*
5 / C10	bax	465462*
6 / B (Control RT)		
7 / B (Control PCR)		
8 / C7	bcl-2	300378
9 / C8	bcl-2	47086
10 / C9	bcl-2	-----*
11 / C10	bcl-2	9891*
12 / B (Control RT)		
13 / B (Control de PCR)		
14 / C7	$\beta 2m$	52764
15 / C8	$\beta 2m$	49616
16 / C9	$\beta 2m$	274117*
17 / C10	$\beta 2m$	302316*
18 / B (Control de RT)		
19 / B (Control de PCR)		
20 / MPM 50 pb		

\*Lecturas a mayor sensibilidad.

Con el objeto de conocer el nivel de expresión de los genes bcl-2 y bax en el tejido tumoral y en el tejido normal, así como la relación en la expresión de estos dos genes en los tumores y en los tejidos control se obtuvieron las razones  $bcl-2/\beta 2m$ ,  $bax/\beta 2m$  y  $bcl-2/bax$ , tanto para las muestras tumorales como para las muestras control. Las figuras 6, 8 y 10 muestran las razones de los valores densitométricos obtenidos para los diferentes genes.

Además, a fin de evidenciar con mayor claridad las diferencias de expresión de los genes bcl-2 y bax entre el tejido tumoral y el tejido control, se obtuvieron las siguientes razones:  $[bcl-2/\beta 2m]_{tumor}/[bcl-2/\beta 2m]_{control}$  y  $[bax/\beta 2m]_{tumor}/[bax/\beta 2m]_{control}$ . Las figuras 7 y 9 muestran los resultados para los distintos pacientes evaluados.

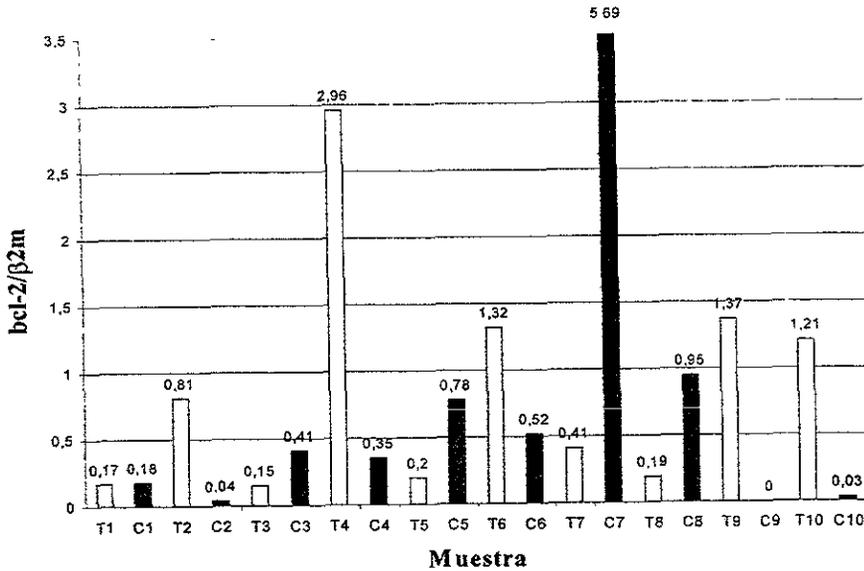


Figura 6.- Razón bcl-2/β2m para las diferentes muestras, calculada a partir de los valores densitométricos de las bandas obtenidas por electroforesis. La letra T identifica a los tumores (barras abiertas) y la letra C a los controles (barras cerradas). En la muestra C9 no se detectó expresión de bcl-2. El número sobre la barra indica el valor de la razón correspondiente.

**Expresión bcl-2/β2m.-** Evaluando el nivel de la expresión de bcl-2 con respecto a la β2m (figura 6) se observa una razón bcl-2/β2m mayor que la unidad en 4 de 10 muestras tumorales (T4, T6, T9 y T10) y menor de uno en 6 de 10 tumores (T1, T2, T3, T5, T7, y T8) (figura 6). De todas las muestras analizadas sólo cuatro muestras tumorales (T4, T6, T9, T10) presentan una razón relativamente alta en relación al resto de las muestras de este tipo de tejido. La muestra C7 presentó también una alta relación bcl-2/β2m, a diferencia de la muestra tumoral correspondiente T7. En estos 5 casos (4 tumores y 1 control), la razón bcl-2/β2m fue mayor que 1, indicando que en estas muestras bcl-2 se expresa en un grado mayor que el gen de expresión constitutiva β2m.

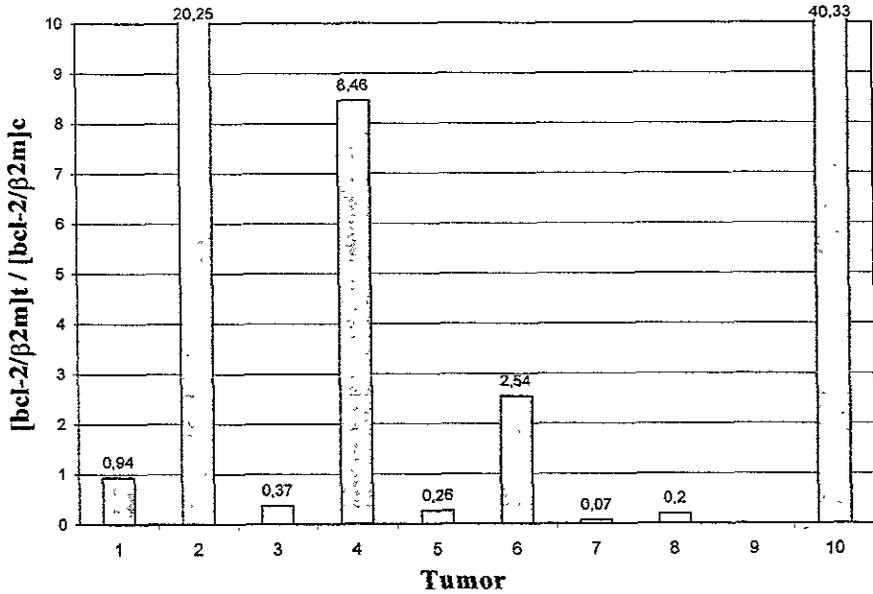


Figura 7.- Razón  $[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}}$  para cada paciente. El valor indica el nivel de expresión de bcl-2 entre tejido tumoral y tejido control. En la muestra C9 no se detectó expresión de bcl-2. El número sobre la barra indica el valor de la razón correspondiente.

**Expresión de bcl-2 en tejido tumoral en relación al tejido control.-** La diferencia en el nivel de expresión de bcl-2 entre el tumor y el tejido control normal se muestra en la figura 7. Como se puede observar, en los casos 2, 4, 6 y 10, bcl-2 se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral en relación al tejido normal.

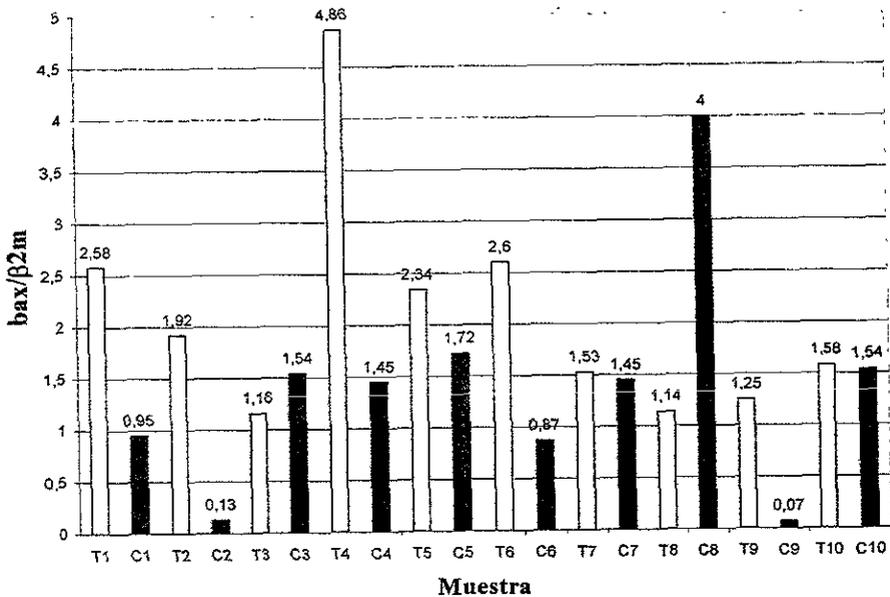


Figura 8.- Razón bax/ $\beta$ 2m para las distintas muestras tumorales y controles, calculada a partir de los valores densitométricos de las bandas obtenidas por electroforesis. El valor de la razón se muestra sobre la barra correspondiente. La letra T identifica a las muestras tumorales (barras abiertas) y la letra C identifica a las muestras control (barras cerradas).

**Expresión de bax/ $\beta$ 2m.-** La evaluación del nivel de la expresión de bax con respecto a la  $\beta$ 2m (figura 8) muestra un valor mayor que la unidad en todas las muestras de tumores (T1 al T10) en la razón bax/ $\beta$ 2m, sin embargo los tumores T3, T8, y T9 se encuentran muy cerca de la unidad (figura 8) y T4 muy alta (4.86). Los datos anteriores resultaron inesperados.

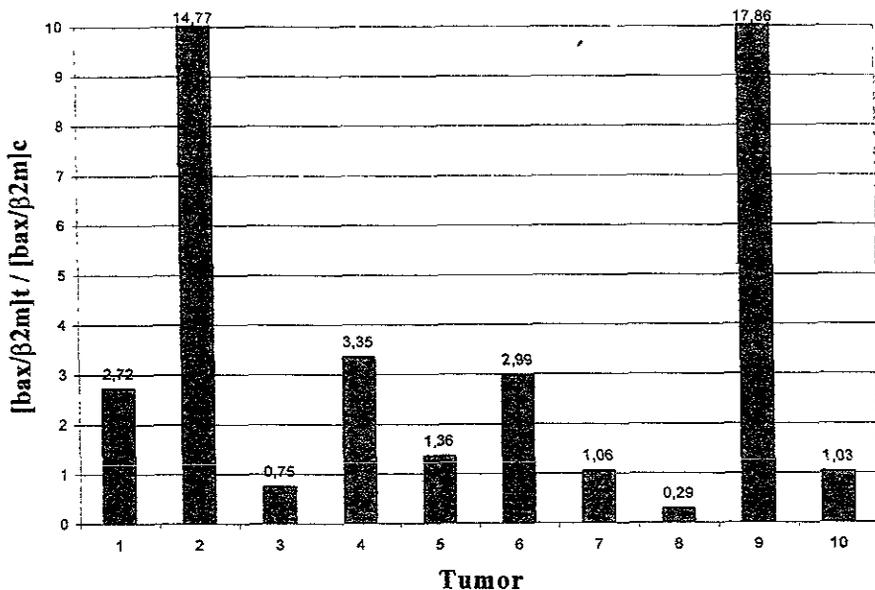


Figura 9.- Diferencia en el nivel de expresión de bax entre los tejidos tumoral y control, dada por la razón  $[bax/\beta 2m]_{\text{tumoral}}/[bax/\beta 2m]_{\text{control}}$ . El número sobre la barra indica el valor de la razón correspondiente.

**Expresión de bax en tejido tumoral en relación al tejido control.-** La diferencia en el nivel de expresión de bax entre ambos tejidos, dada por la razón  $[bax/\beta 2m]_{\text{tumoral}}/[bax/\beta 2m]_{\text{control}}$ , está representada en la figura 9, se observa que en las muestras T1, T2, T4, T6, y T9 bax se encuentra sobreexpresado en relación al tejido control. En los casos 3, 5, 7 y 10 el nivel de expresión es similar en ambos tejidos, con valores de la razón  $[bax/\beta 2m]_{\text{tumoral}}/[bax/\beta 2m]_{\text{control}}$  cercanos a la unidad (Figuras 8 y 9).

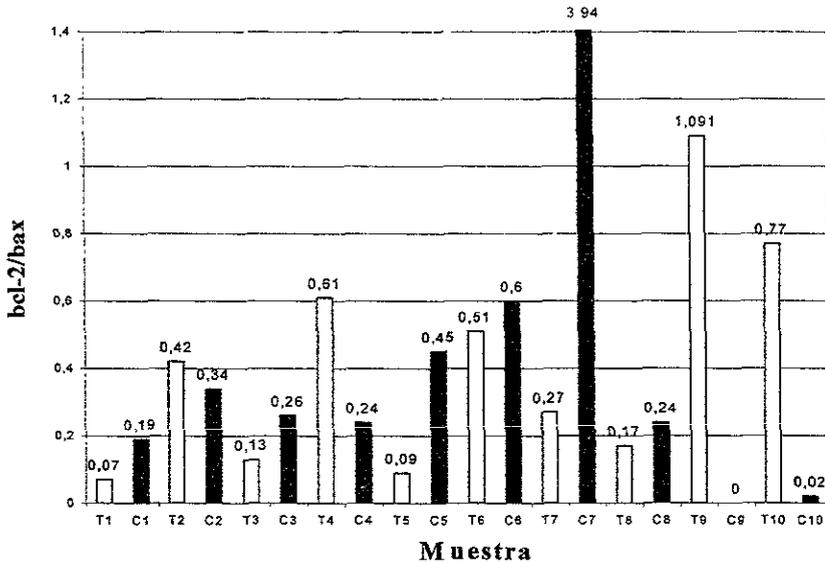


Figura 10.- Valores de la razón bcl-2/bax calculados a partir de las lecturas densitométricas de las diferentes bandas obtenidas por electroforesis. La T indica que se trata de una muestra tumoral (barras abiertas) y la C indica que se trata de una muestra control (barras cerradas). El número sobre la barra indica la razón bcl-2/bax.

**Expresión de bcl-2/bax.-** En una muestra tumoral (T9) se presenta una razón bcl-2/bax mayor que 1.0 y 9 de 10 muestras tumorales (T1 a T8 y T10) presentan una razón bcl-2/bax menor de 1.0, estos datos se muestran en la figura 10. En esta figura se observa que los tumores T2, T4, T9 y T10 expresan a bcl-2 en mayor grado que sus respectivos controles, mientras que bax es expresado en menor grado que en sus respectivos controles en T1, T3, T5, T6, T7 y T8.

respecto al tejido control (figuras 7 y 9). Estos tumores (T4 y T6) presentan para bcl-2 una relación  $[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}}$  de 8.46 y 2.54, respectivamente y una relación  $[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}}$  de 3.35 y 2.99, respectivamente. El tumor T7, que también presenta una etapa Dukes' B2, expresa bcl-2 en menor grado que el tejido control ( $[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}} = 0.07$ ) y el nivel de expresión de bax es semejante al del tejido control ( $[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}} = 1.06$ ). Por otro lado, se tienen dos tumores correspondientes a PAF (poliposis adenomatosa familiar) que son las muestras T3 y T9 y que corresponden a dos hermanos, en estas dos muestras no se encontraron resultados concordantes entre uno y otro caso. Las muestras tumorales T2 y T8, ambas procedentes de tumores en etapa Dukes' B1, presentan un patrón de expresión opuesto tanto para bcl-2 como para bax, estando bcl-2 y bax sobre-expresado en T2, mientras que en T8 el nivel de expresión de ambos genes es aproximadamente diez veces menor al de la  $\beta 2\text{m}$  (figuras 7 y 9).

El tumor T10, cuyo desarrollo es avanzado (T3N3M1 o D), mostró una relación  $[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bcl-2}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}}$  muy alta (40.33) pero una relación  $[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{tumor}}/[\text{bax}/\beta 2\text{m}]_{\text{control}}$  muy baja (1.03) lo que significa que con respecto al tejido control, este tumor sobre-expresa a bcl-2 pero no a bax. Este resultado concuerda con el hecho de que un tumor puede ver favorecido su desarrollo al sobre-expresar genes que favorecen la sobrevivencia celular, como bcl-2; sin embargo, este resultado es producto del análisis de un sólo tumor, por lo que podría no ser significativo.

**Expresión de transcritos de bax de 330, 500 y 530 bp.-** En los resultados de los experimentos en los que se evaluó la expresión de bax en el tejido tumoral (figuras 2 y 3) se

puede observar además de la banda principal de 479 pb, bandas adicionales de ~330 pb, ~500 pb y ~530 pb, las cuales podrían corresponder a variantes transcripcionales de bax, aunque no se descarta la posibilidad de que sean productos de amplificación inespecífica. Se ha reportado en la literatura la presencia de transcritos correspondientes a por los menos 5 formas alternativas de bax:  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \omega$  (ver esquema 5, página 34). Cabe señalar que estas bandas a diferencia de las muestras tumorales no aparecen en la mayoría de las muestras control. Además, todas las muestras de los tumores, así como las muestras control, se sometieron a condiciones experimentales de amplificación idénticas y dado que no se observan evidencias de degradación de las muestras, las distintas bandas observadas pueden ser atribuidas a diferencias intrínsecas de las muestras, especialmente en lo que se refiere a la presencia de transcritos alternativos de bax en el tejido tumoral.

**Banda de bax de 330pb.-** La banda de ~330 pb apareció en casi todos los tumores colorrectales (T1, T2, T4, T5 T6, T7, T8 y T10), observándose muy intensa en el tumor T10 (carril 12, figura 3). Esta banda es similar a la observada en la muestra de células SW620 (SW), las cuales derivan de una metástasis linfática de cáncer colorrectal (carril 15, figura 3), la muestra T10 también presenta metástasis. Las dos muestras negativas para la banda de ~330 pb (casos T3 y T9) corresponden a los dos pacientes que presentan Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF). En la mayoría de los casos de tejido control (8 de 10) no se observó la banda de ~330 pb, solo en los casos C8 y C10, se observa de manera apenas perceptible, estos dos tejidos podrían ya no ser normales desde el punto de vista molecular, sin embargo hacen falta más evidencias para sustentar esta hipótesis.

**Banda de bax de 500 bp.-** Este transcrito parece estar presente en casi todas las muestras tumorales y en al menos cinco muestras control (C1, C4, C5, C6 y C10), sin embargo, en algunos casos se encuentra demasiado cerca de la banda principal de bax (479 pb) y no se puede afirmar que la banda está presente; esta banda podría corresponder a algún transcrito alternativo de bax (tabla 11).

**Banda de bax de 530 bp.-** La banda de ~530 pb podría corresponder a otro de los posibles transcritos alternativos de bax; esta banda se observa en 2 muestras control (C4 y C5). En las muestras tumorales se observa claramente en 8 de 10 (T1, T2, T3, T4, T7, T8, T9, T10); esta banda está ausente solamente en los tumores T5 y T6. Además está presente en las células SW620.

La tabla 11 muestra más claramente las diferencias que presentan estas bandas extras entre tejido control y tejido tumoral. La intensidad de las bandas se determinó por simple inspección de los negativos fotográficos.

TABLA 11.- PRESENCIA DE LAS BANDAS ADICIONALES QUE SE PRESENTAN PARA EL GEN BAX. LAS MUESTRAS TUMORALES SE IDENTIFICAN CON LA LETRA T Y LAS CONTROLES CON LA LETRA C.

Muestra	Banda de ~330 pb	Intensidad	Banda de ~500 pb	Intensidad	Banda de ~530 pb	Intensidad
T1	+	+++	+	+	+	+
T2	+	+	+	++	+	++
T3	-		+	++	+	++
T4	+	++	+	++	+	+
T5	+	+++	+	+	-	
T6	+	++	+	++	-	
T7	+	+	+	+	+	++
T8	+	++	+	+++	+	++++
T9	-		+	+++	+	+
T10	+	+++++	-		+	+++
C1	-		+	+	-	
C2	-		-		-	
C3	-		∅		-	
C4	-		+	++	+	++
C5	-		+	++	+	+
C6	-		+	++	-	
C7	-		∅		-	
C8	+	+	∅		-	
C9	-		-		-	
C10	+	+	+	+	-	

T:tumor, C: control

-: ausencia de banda; +: muy baja intensidad; ++: baja intensidad; +++: intensidad moderada; ++++: intensidad elevada; +++++: intensidad muy elevada.

En la tabla 12 se tienen dos casos en los que el valor de la razón  $bax/\beta 2m$  es semejante, pero la intensidad de la banda de ~330 pb difiere. Esto indica que en ambos casos el nivel de expresión de bax es similar, pero la banda de ~330 pb es más intensa en T1 que en T6, aún cuando la razón  $bax/\beta 2m$  sea menor.

**TABLA 12.-MUESTRAS QUE PRESENTAN UN NIVEL DE EXPRESIÓN SEMEJANTE  
 PARA BAX ALFA, DADO POR LA RAZÓN  $bax/\beta_{2m}$ , PERO DISTINTA INTENSIDAD EN  
 LA BANDA DE  $\sim 330$  PB.**

Muestra	$bax/\beta_{2m}$	Intensidad de la banda de $\sim 330$ pb
T1 (carril 3, fig. 2)	2.58	++
T6 (carril 18, fig. 2)	2.60	+
T7 (carril 3; fig. 3)	1.53	+
T10 (carril 12, fig. 3)	1.58	+++

+++ : intensa, ++ : fuerte; + : media

## **VII.-DISCUSIÓN:**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la técnica de RT-PCR es adecuada para detectar el ARNm correspondiente a los genes bax y bcl-2. En otros trabajos se ha reportado que la expresión de ARNm de bcl-2 en cáncer colorrectal es indetectable por Northern blot (82).

Nuestros resultados muestran que en 4 de 10 casos (2, 4, 6 y 9) se presentan mayores niveles de ARNm tanto de bcl-2 como de bax  $\alpha$  en la muestra de tejido tumoral en relación al tejido control (figuras 6, 7, 8 y 9), en 6 de 10 casos (1, 2, 4, 5, 6 y 9) se observó mayor expresión de bax  $\alpha$  en el tejido tumoral (figuras 8 y 9) y en 5 de 10 casos (2, 4, 6, 9 y 10) bcl-2 se expresó en mayor grado en el tejido tumoral (figura 6). Estos resultados indican que no existe diferencia a nivel de ARNm de ninguno de estos dos genes, bcl-2 y bax, entre tejido tumoral y tejido control. Posiblemente, se requiera de una muestra más numerosa para determinar con mayor precisión si existe alguna tendencia de estos dos genes a sobre-expresarse ya sea en el tejido control o en el tejido tumoral. Otra posibilidad es que algunas muestras control sean anormales, sin que presenten alteraciones histológicas evidentes, pero que su condición se refleje en un patrón de expresión alterado de los genes evaluados.

Los resultados publicados en la literatura relacionados a la expresión de las proteínas y del ARNm de estos genes, en cáncer colorrectal así como en líneas celulares provenientes de cáncer colorrectal, son contradictorios. Kanavaros y col. (96) estudiaron la expresión de Bax con técnicas inmunohistoquímicas, habiendo encontrado una correlación significativa entre la baja expresión de Bax y los carcinomas en etapa Dukes' C, los cuales son relacionados con metastásis hacia nódulos linfáticos, estos autores concluyeron que los

bajos niveles de Bax posiblemente juegan un papel en etapas tardías del desarrollo del cáncer colorrectal. Por su parte, Maurer y col. (82) al evaluar la expresión ARNm de bax por Northern blot en tumores colorrectales, encontraron que este gen estaba ligeramente sobre-expresado en el 75% de las muestras cancerosas evaluadas (82). En el presente trabajo la expresión de bax a nivel de ARNm es mayor en el tejido tumoral que en el tejido control en 60% de las muestras (figura 9).

En el reporte de Kanavaros y col. (96), la expresión de Bcl-2 no se relacionó con la etapa ni con el grado de diferenciación del tumor, mientras que Leahy y col. (95) al evaluar Bcl-2 también con técnicas inmunohistoquímicas, encuentran que su expresión predomina en tumores bien diferenciados pero no se relaciona con la etapa de los mismos, además encuentra que la expresión de Bcl-2 se asocia con un mejor pronóstico de la enfermedad a largo plazo, resultado semejante al reportado por Baretton (80) y por Öfner (75) quienes encuentran que la expresión de Bcl-2 se asocia con un mejor curso clínico de la enfermedad. Kaklamanis y col. (78, 98) han reportado que la expresión de Bcl-2 acompañada de una ausencia en la expresión de p53 se asocia con etapas de Dukes' tempranas, mientras que el fenotipo inverso se asocia con etapas avanzadas de Dukes' y un mal pronóstico. Sin embargo, Tollenar y col. (99) no encuentran relación alguna entre el pronóstico y la expresión de Bcl-2 y p53, por su lado Ilyas (100) no encuentra relación entre la expresión de Bcl-2 y p53, pero sí entre la pérdida de expresión de Bcl-2 y la recurrencia del tumor. Kaklamanis (78), Watson (79) y Hao (97) reportan que la expresión de la proteína Bcl-2 se reduce conforme el cáncer colorrectal progresa, sin embargo otros trabajos (73, 74) reportan no haber encontrado diferencias en la expresión de Bcl-2 entre

tumores y adenomas, ni entre líneas celulares provenientes ya sea de adenomas o de carcinomas.

En lo que sí parecen estar de acuerdo los diferentes autores es en el hecho de que la expresión de la proteína Bcl-2 es un evento temprano en el inicio de la tumorigénesis colorrectal (73, 74, 80, 81, 99, 100).

Estudios previos llevados a cabo en cáncer de vejiga, en leucemia linfocítica crónica y cáncer testicular (87-91) han demostrado que el valor de la razón bcl-2/bax a nivel de ARNm o de proteína, se relaciona con el pronóstico de la enfermedad, encontrándose que altos valores de esta relación se asocian con un mal pronóstico y falta de respuesta al tratamiento por presencia de fármaco-resistencia, mientras que un valor reducido se asocia con respuesta al tratamiento y mejor evolución de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en el caso del cáncer colorrectal el nivel de expresión a nivel de ARNm de los genes bcl-2 y bax, dado por la relación bcl-2/bax, para los 10 casos evaluados presenta en general valores menores que 1 (fig. 10), tanto en tejido tumoral como en tejido control, con 6 de 10 casos (1, 3, 5-8) presentando mayores valores en el tejido control, lo que puede interpretarse ya sea como una menor expresión de bcl-2 en el tejido tumoral o como una mayor expresión de bax en este mismo tejido. Estos resultados llaman la atención ya que no concuerdan con nuestra hipótesis, que era encontrar una mayor expresión de bcl-2 en los tumores con relación a los tejidos normales, es decir, valores de la relación bcl-2/bax mayores a la unidad en los tejidos tumorales, esto puede estar relacionado a reportes cuyos resultados parecen indicar que bcl-2 y bax no juegan un papel determinante en el cáncer colorrectal (81, 82) y sí otros miembros de la familia bcl-2, como bcl-xl y bak.

Nuestros resultados indican que una cantidad importante del ARNm expresado para *bax* corresponde a *bax*  $\alpha$ . Sin embargo, se observa una diferencia entre tumores y controles con respecto a las bandas de ~330 pb y ~530 pb, presentándose estas últimas en la mayoría de las muestras tumorales. Los oligonucleótidos empleados para identificar a *bax* se localizan en los exones 2 (oligonucleótido con sentido) y 6 (oligonucleótido antisentido) por lo tanto, teóricamente son capaces de detectar los transcritos correspondientes a *bax*  $\alpha$ , *bax*  $\beta$ , *bax*  $\delta$  y *bax*  $\omega$ . *bax*  $\gamma$  no se detecta porque carece del exón 2 (ver esquema 5, pág. 34). Las longitudes de los exones e intrones de interés son las siguientes: exón 2, 53 pb; exón 3, 147 pb; exón 4, 135 pb; exón 5, 105 pb; exón 6, 37 pb hasta donde abarca el oligonucleótido utilizado; intrón 5, 630 pb (35). La señal principal de 479 pb, corresponde a *bax*  $\alpha$ . *bax*  $\beta$  teóricamente debe generar un segmento de 1,109 pb pues contiene al intrón 5 de 630 pb. *bax*  $\delta$ , al carecer del exón 3, que tiene una longitud de 147 pb, generaría un fragmento de 332 pb. *bax*  $\omega$ , al cual se le adiciona un segmento de 49 pb del intrón 5 entre los exones 5 y 6, teóricamente generaría un fragmento de 528 pb. Como se mencionó antes, al correr la electroforesis se observaron bandas extras en los carriles correspondientes a *bax*, el peso molecular de dos de ellas parece concordar con el peso molecular de los segmentos esperados para los transcritos de *bax*  $\delta$  (332 pb), el cual contiene a los exones 1, 2, 4, 5 y 6; y de *bax*  $\omega$  (528 pb), que presenta los exones 1 al 6 además de un pequeño segmento del intrón 5 de 49 pb (esquema 5); cada uno de estos transcritos teóricamente se traduce en una proteína distinta a *Bax*  $\alpha$  y, al menos en el caso de *Bax*  $\omega$ , con funciones aparentemente opuestas (69).

Si los niveles de ARNm reflejan los niveles de proteína, estas diferencias podrían ser importantes, indicando un posible papel de Bax  $\delta$  y Bax  $\omega$  en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal, explicando hasta cierto punto la presencia de una banda de ~330 pb tan intensa en la muestra T10, la cual al igual que T1 presentan metástasis. Esta banda se presenta también en la línea celular de cáncer de colon SW620, la cual es metastásica. Para determinar con mayor precisión la posible participación de bax  $\delta$  y bax  $\omega$  en la progresión del cáncer colorrectal, será necesario analizar un mayor número de muestras, tanto metastásicas como no metastásicas y adenomatosas a fin de evidenciar que realmente existen diferencias en el patrón de expresión de estos transcritos alternativos.

La mayoría de los reportes que existen en la literatura, presentan simplemente el papel de bax, entendiéndose que se trata de bax  $\alpha$  y generalmente no reportan ni mencionan la presencia ya sea de transcritos alternativos o de proteínas distintas a la forma alfa. La existencia de transcritos alternativos, no solo de bax, si no también de otros miembros de esta familia, como bcl-x, bcl-2 y bim, algunos de los cuales pueden codificar para proteínas pro-apoptóticas como bcl-xs y otros para proteínas anti-apoptóticas como bcl-xl, o generar proteínas con diferente poder pro-apoptótico, como ocurre con bim (49), señala la gran importancia que puede tener el empalme alternativo en esta familia de genes.

La banda extra que se observa en las electroforesis, con un peso molecular de ~500 pb podría corresponder a otro transcrito alternativo de bax aún no reportado, el cual debe conservar las secuencias reconocidas por los oligonucleótidos empleados en este trabajo, esto, como se mencionó anteriormente, sin descartar la posibilidad de que se trate de productos de amplificación inespecífica. Así como se ha observado que la expresión de las diferentes formas alternativas de bax varía de un tejido a otro (35,69), esta banda podría

corresponder a un transcrito característico del epitelio intestinal e incluso podría estar involucrado en la progresión del cáncer colorrectal, al presentarse en 5 muestras control (C1, C4, C5, C6 y C10) frente a 9 muestras tumorales (T1 al T9).

Así pues, al menos dos bandas extras de bax, la de 330 pb (bax  $\delta$ ) y la de 530 pb (bax  $\omega$ ) parecen corresponder a transcritos alternativos de bax.

Algunas observaciones que apoyan el hecho de que las bandas extra de bax podrían corresponder a transcritos alternativos son las siguientes observaciones:

La coincidencia del peso molecular de las bandas obtenidas y el peso molecular teórico del segmento correspondiente a los transcritos de bax  $\delta$  y bax  $\omega$  que se generaría de acuerdo con los oligonucleótidos utilizados.

Las diferencias en intensidad de las bandas correspondientes a 330 pb, 500 pb y 530 pb son diferentes en los distintos tumores y por otro lado no aparecen en la mayoría de los controles, la banda de 330 pb solamente en dos casos se percibe de manera muy débil (muestras C8 y C10, figura 5).

Otra observación más a favor de que las bandas extras no son consecuencia de la amplificación inespecífica, se obtiene al analizar la razón bax/ $\beta$ 2m, la que nos indica el nivel de expresión de bax. Como se observa en los datos de la tabla 12, razones semejantes para bax/ $\beta$ 2m presentan diferentes intensidades de las bandas de ~330 pb.

Existe evidencia que parece indicar que la variante  $\omega$  de bax es capaz de favorecer la sobrevivencia celular (69), lo mismo que la propia forma alfa en ciertos contextos celulares (72,82), así como también existe evidencia de que estas diferentes formas alternativas del gen se expresan en diferente grado de un tejido a otro (35,69). Una pregunta que se plantea es qué factores determinan la expresión de una u otra forma alternativa del

gen en una célula o en los distintos tejidos, pues de ello se podrían potencialmente derivar tratamientos antineoplásicos tejido específicos. Por otro lado, estas formas alternativas podrían actuar como reguladores de la función pro-apoptótica de Bax  $\alpha$ , compitiendo por ejemplo con los mismos blancos celulares o formando dímeros con Bax  $\alpha$  y evitando así que lleve a cabo su función. La diferente funcionalidad y el diferente patrón de expresión de estas formas alternativas podrían explicar porqué los ratones macho “knock-out” para bax presentan por un lado hiperplasia en el tejido linfoide y por otro esterilidad debida a una muerte celular apoptótica excesiva en el sistema reproductor.

No se debe desechar la posibilidad de que el patrón de expresión de los transcritos alternativos de bax esté vinculado con las agresiones tóxicas del medio ambiente a las que está sujeto el individuo durante su vida, por ejemplo radiaciones o ciertas sustancias en el contenido intestinal, provenientes de alimentos de consumo habitual que pueden ser absorbidas en el intestino, las cuales pudieran afectar la regulación de la expresión genética.

## **VIII.- CONCLUSIONES:**

- 1) No existe una tendencia en los genes estudiados a sobre-expresarse ya sea en el tejido tumoral o en el tejido control.
  
- 2) El valor de la razón bcl-2/bax no permite definir un patrón de expresión diferencial de estos dos genes entre el tejido tumoral y el tejido control.
  
- 3) La expresión de los genes bcl-2 y bax no sigue un patrón definido conforme progresa el cáncer colorrectal.
  
- 4) Si las bandas extras corresponden a transcritos alternativos, el correspondiente a la banda de 330 pb podría jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer colorrectal ya que las muestras de tejidos provenientes de cáncer metastásico (T1, T10, además de la línea celular SW620) la expresan en mayor grado. En los casos de PAF, la banda de 330 pb esta ausente, esto implica una diferencia importante entre el cáncer de colon esporádico y una enfermedad que deriva en cáncer colorrectal como es la poliposis adenomatosa familiar (PAF).
  
- 5) Posteriores trabajos deberán desarrollarse a fin de confirmar que las bandas extras corresponden a transcritos alternativos de bax y para determinar la posible utilización de algunos de ellos, como el correspondiente a la banda de 330 pb (bax  $\delta$ ), como un marcador en la progresión del cáncer colorrectal.

## **IX.- REFERENCIAS:**

- (1) Rubenstein E, Federman DD, editores: Scientific American, Medicina, Vol. 5, sección 13 (Oncología), subsección V "Crecimiento tumoral y quimioterapia.", actualización # 4 de 1997. (Actualización en medicina), pp. 11-17.
- (2) Fialkow PJ: Clonal origin and stem cell evolution of human tumors. Genetics of Human Cancer. Mulvihill JJ, Miller RM, Fraumeni JF, Eds. Raven Press, New York, 1977, p 439.
- (3) Nowell PC: Mechanisms of tumor progresion. Cancer Res 46:2203-2207, 1986.
- (4) Heppner GH: Tumor Heterogeneity. Cancer Res 44:2259-2265, 1984
- (5) Nowell PC: Molecular events in tumor development. N Engl J Med 319:575-576, 1988.
- (6) Lewin B: Oncogenes and cancer. En: Genes VI. Oxford University Press, USA, 1997, p 1133.
- (7) Rubenstein E, Federman DD, editores: Scientific American, Medicina, Vol. 5, sección 13 (Oncología), subsección II "Mecanismos moleculares de la carcinogénesis.", actualización # 6 de 1993. (Actualización en medicina).
- (8) Ellisen LW, Haber DA: Mechanisms of tumor suppressor genes. Science and Medicine, Jul-Aug 1998, pp 26-35.
- (9) Lewin B: Oncogenes and cancer. En: Genes VI. Oxford University Press, USA, 1997, p 1134.
- (10) Bishop JM: The molecular genetics of cancer. Science 235:305-311, 1987.
- (11) Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer Statics, 1993; CA Cancer J Clin, 43:7, 1993.
- (12) Rubenstein E, Federman DD, editores: Scientific American Medicina; Vol. 5, sección 13 (Oncología), subsección I "Epidemiología y prevención del cáncer", actualización # 5 de 1994. (Actualización en Medicina).

- (13) Rubenstein E, Federman DD, editores: Scientific American Medicina; Vol. 5, sección 13 (Oncología), subsección III "Biopatología del cáncer", 1994. (Actualización en Medicina).
- (14) Mathews CK, van Holde KE: Biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, 1996, pp 907-909.
- (15) Mathews CK, van Holde KE: Biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, 1996, pp 1072-1073.
- (16) Lewin B: Messenger RNA. En: Genes VI. Oxford University Press, USA, 1997, pp 153-178.
- (17) Rudin CM, Thompson CB: Apoptosis and Disease: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death. *Ann. Rev. Med.* 48:267-281, 1997.
- (18) Duke RC, Ojcius DM, Young DE: Suicidio celular en la salud y en la enfermedad; *Inv. y Ciencia*, febrero, 1997, pp. 44-52.
- (19) Williams GT: Programmed Cell Death: Apoptosis and Oncogenesis, *Cell*, 65: 1097-1098, 1991.
- (20) Fisher DE: Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the threshold, *Cell*, 78:539-542, 1994.
- (21) Williams GT, Smith CA: Molecular Regulation of Apoptosis: Genetic controls of cell death, *Cell*, 74: 777-779, 1993.
- (22) Sen S, D'Incalci M: Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy, *FEBS Letters*, 307: 122-127, 1992.
- (23) Cai J, Yang J, Jones DP: Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochym. Biophys. Acta*, 1366:139-149, 1998.

- (24) Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more, *Biochym. Biophys. Acta*, 1366:151-165, 1998.
- (25) Raff M: Cell suicide for beginners, *Nature*, 396:119-122, 1998.
- (26) Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development, *Cell*, 88:347-354, 1997.
- (27) Lieberman D: How to screen for colon cancer. *Annu. Rev. Medicine*, 49:163-172, 1998.
- (28) Scientific American Medicina, Tomo 5, Sección 13: Oncología, Subsección VIII: Cáncer del aparato digestivo; Actualización #5 de 1996 (Actualizaciones bimestrales), Editora Científica Médica Latinoamericana.
- (29) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-767, 1990.
- (30) Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B: Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*, 238:193-196, 1987.
- (31) Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281:1322-1326, 1998.
- (32) Chao DT, Korsmeyer SJ: Bcl-2 Family: Regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol*, 16:395-419, 1998.
- (33) Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335:440-442, 1988.
- (34) Pan G, O'Rourke K, Dixit VM: Caspase-9, Bcl-x1, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.*, 273:5841-5845, 1998.

- (35) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74:609-619, 1993.
- (36) Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB: Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-xl. *Mol. Cell. Biol.*, 17:7040-7046, 1997.
- (37) Hsu Y, Youle RJ: Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.*, 273: 10777-10783, 1998.
- (38) Tsujimoto Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:5214-5218, 1986.
- (39) Reed JC, Jurgensmeier JM; Matsuyama S: Bcl-2 family proteins and mitochondria; *Biochim. Biophys. Acta*, 1366:127-137, 1998.
- (40) Knudson CM, Korsmeyer SJ: Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death; *Nature Genetics*, 16:358-363, 1997.
- (41) Wolter KG, Hsu Y, Smith CL, Nechustan A, Xi X, Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis; *J. Cell Biol.*; 139:1281-1292, 1997.
- (42) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning, a laboratory manual*; 2<sup>nd</sup> edition; Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- (43) Lefkovits I (editor): *Immunology methods manual*; Academic Press, 1997, Vol. 1.
- (44) Weinberg RA: Así se produce el cáncer; *Investigación y Ciencia*, Noviembre, 1996.
- (45) Nagata S: Apoptosis by Death Factor; *Cell*; 88:355-365, 1997.
- (46) Dieffenbach CW, Dveksler GS (editors): *PCR Primer: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.

- (47) Sato K, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang H, Reed J: Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two hybrid system; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 91:9238-9242, 1994.
- (48) Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 92:7834-7838, 1995.
- (49) Kelekar A; Thompson CB: Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis; *Trends in Cell Biology*, 8:386-401, 1996.
- (50) Yang E, Korsmeyer SJ: Molecular Thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death; *Blood*, 88:386-401, 1996.
- (51) Nuñez G, Clarke MF: The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival; *Trends in Cell Biology*, 4:399-403, 1994.
- (52) Reed JC: Double identity for proteins of the Bcl-2 family; *Nature*, 387:773-776, 1997.
- (53) Mathews CK, van Holde KE: *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, 1996, pp 895, 1044.
- (54) Kroemer G: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis; *Nature Medicine*, 3:614-620, 1997.
- (55) O'Reilly LA, Huang DCS, Strasser A: The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry; *The EMBO Journal*, 15:6979-6990, 1996.
- (56) Vairo G, Innes KM, Adams JM: Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival; *Oncogene*, 13:1511-1519, 1996.

- (57) Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ: Cross talk between cell death and cell cycle progression: Bcl-2 regulates NFAT-mediated activation; *Proc. Natl Acad. Sci.*, 93:9545-9552, 1996.
- (58) Brady HJM, Gil-Gómez G, Kirberg J, Berns AJM: Bax  $\alpha$  perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells; *The EMBO Journal*, 15:6991-7001, 1996.
- (59) Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division; *Cell*, 88:323-331, 1997.
- (60) Tanaka S, Saito K, Reed JC: Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein; *J. Biol. Chem.*, 268:10920-10926, 1993.
- (61) Cleary ML, Smith SD, Sklar J: Cloning and Structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14,18) traslocation; *Cell*, 47:19-28, 1986.
- (62) Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennett S, Goldman P and Korsmeyer SJ: Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma; *The EMBO Journal*, 7:123-131, 1988.
- (63) Yu Hsu S, Hsueh AJW: A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro; *J. Biol. Chem.*, 273:30139-30146, 1998.
- (64) Li H, Zhu H Xu C, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis; *Cell*, 94:491-501, 1998.
- (65) Haldar S, Basu A, Croce C: Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity; *Cancer Res.*, 57:229-233, 1997.

- (66) Borner C, Martinou I, Mattmann C, Irmeler M, Schaerer E, Martinou JC, Tschopp J: The protein Bcl-2  $\alpha$  does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis; *J. Cell Biol.*, 126:1059-1068, 1994.
- (67) Nguyen M, Branton PE, Walton PA, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ and Shore GC: Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus; *J. Biol. Chem.*; 269:16521-16524, 1994.
- (68) Apte SS, Mattei MG, Olsen BR: Mapping of the human bax gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively sliced transcript, bax  $\delta$ ; *Genomics*, 26:592-594, 1995.
- (69) Zhou M, Demo SD, McClure TN, Crea R, Bitler CM: A novel splice variant of the cell death-promoting protein Bax; *J. Biol. Chem.*, 273:11930-11936, 1998.
- (70) Hunter JJ, Parslow TG: A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis; *J. Biol. Chem.*, 271:8521-8524, 1996.
- (71) Brady HJM, Gil-Gómez G: Molecules in focus. Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax; *Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, 30:647-650, 1998.
- (72) Middleton G, Nunez G, Davies AM: Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors; *Development*, 122:695-701, 1996.
- (73) Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Paraskeva C: Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas; *Oncogene*, 9:33667-3370, 1994.
- (74) Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B: bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis; *Cancer Res.*, 55:237-241, 1995.
- (75) Ofner D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Totsch M, Bocker W, Jasani B, Schmid KW: Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal

carcinoma: correlation with tumor stage and patient survival; *British Journal of Cancer*, 72:981-985, 1995.

(76) Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauser BA, Hamilton SR, Jones RJ: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer; *Cancer Res.* 55:1811-1816, 1995.

(77) Kitcher Philip, "The lives to come, the genetic revolution and human possibilities", Penguin Books, England, 1997, p. 60.

(78) Kaklamanis L (et al): Early expression of bcl-2 protein in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia; *J. Pathol.*, 179:10-14, 1996.

(79) Watson AJM (et al): Evidence for reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas; *British J. Cancer*, 73:889-895, 1996.

(80) Bruno Baretton G (et al): Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expresión in colorectal adenomas and carcinomas; *Cancer*, 77:255-264, 1996.

(81) Krajewska M (et al): Elevated expression of bcl-xl and reduced bak in primary colorectal adenocarcinomas; *Cancer Res.*, 56:2422-2427, 1996.

(82) Maurer CA (et al): Apoptosis inhibiting factor Bcl-xl might be the crucial member of the Bcl-2 gene family in colorectal cancer; *Dig. Dis. Sci.*, 43:2641-2648, 1998.

(83) Rampino N (et al): Somatic frameshift mutations in the bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype; *Science*, 275:967-969, 1997.

(84) Abdel-Rahman WM (et al): Role of Bax mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis; *Oncogene*, 18:2139-2142, 1999.

(85) Gil J (et al): Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers; *Cancer Res.*, 59:2034-2037, 1999.

- (86) Miyashita T, (et al): Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo; *Oncogene*, 9:1799-1805, 1994.
- (87) Gazzaniga P, (et al): bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer; *Int. J. Cancer*; 69:100-104, 1996.
- (88) Wheaton S, (et al): Bcl-2 and Bax protein expression in indolent versus aggressive B-cell non-Hodkin's lymphomas; *Human Pathol.*, 29:820-825, 1998.
- (89) Pepper C. (et al): Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia; *British J. Haematology*, 95:513-517, 1996.
- (90) Pepper C, Bentley DP: Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance; *British J. Cancer*, 76:935-938, 1997.
- (91) Thomas A, (et al): Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance; *Oncogene*, 12:1055-1062, 1996.
- (92) Chresta C. (et al): Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio; *Cancer Res.*, 56:1834-1841, 1996.
- (93) Findley HW (et al): Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia; *Blood*, 89:2986-2993, 1997.
- (94) Mathews CK, van Holde KE: *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, 1996, p. 1073.

- (95) Leahy DT (et al): bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer; *Histopathology*, 35:360-367, 1999.
- (96) Kanavaros P (et al): Expression of p53, p21/waf, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in colorectal adenocarcinomas; *Med Oncol*, 16:23-30, 1999.
- (97) Hao XP, Ilyas M, Talbot IC: Expression of Bcl-2 and p53 in the colorectal adenoma-carcinoma sequence; *Pathobiology*, 65:140-145, 1997.
- (98) Kaklamanis L (et al): bcl-2 protein expression: association with p53 and prognosis in colorectal cancer; *British J Cancer*, 77:1864-69, 1998.
- (99) Tollenaar R (et al): Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance; *British J Cancer*, 77:1842-47, 1998.
- (100) Ilyas M (et al): Loss of Bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer; *Gut*, 43:383-387, 1998.
- (101) Tovar-Guzmán (et al): Epidemiologic panorama of colorectal cancer in Mexico, 1980-1993; *Dis Colon Rectum*, 41:225-231, 1998.

## **X.- APÉNDICE:**

A continuación se indica la composición y preparación de las diferentes soluciones empleadas:

### **Amortiguador de corrida para ARN:**

(cantidades para 2L de amortiguador 5X)

Acetato de sodio 50 mM:	1.6 L
EDTA 0.5 M:	20 mL
MOPS:	41.2 g
Agua libre de RNAsas:	cbp 2L

### **Amortiguador de carga para ARN:**

EDTA 1 mM 49.5 % v/v.
Glicerol 50 %
Azul de bromofenol 0.25% p/v
Xilencianol 0.25% p/v

### **Etanol al 75% libre de ribonucleasas:**

Componentes:

Etanol absoluto: 75 mL

Agua desionizada tratada con DEPC: 25 mL

En una probeta estéril de 100 mL se mezclan los volúmenes indicados. La solución se guarda en un frasco estéril.

### **Solución de Bromuro de etidio:**

Componentes:

Bromuro de etidio: 1 mg

Agua estéril: 1 mL

En una balanza analítica se pesan 0.0010 g, mismos que se colocan en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual posteriormente se adiciona 1 mL de agua estéril.

**Amortiguador de carga para ADN:**

Glicerol 30% v/v.

Azul de bromofenol 0.25% p/v.

Xilencianol 0.25% p/v.

Agua desionizada estéril.

**Amortiguador de Corrida para ADN:**

Cantidades para preparar 1L 5X

Tris base 54 g

Ácido bórico 27.5 g

EDTA 0.5 M pH = 8.0 20 mL

Agua desionizada estéril cbp 1000 mL