



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

*DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL EXTREMO
CARBOXILO-TERMINAL DE β -CATENINA EN BIOPSIAS
DE PACIENTES CON CÁNCER DE COLON*

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON
MENCIÓN EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE

AUTORA: Catalina Flores Ruz

TUTOR : Dr. Julio Tapia P.

CO-TUTOR: Dra. Luisa Herrera

2009

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|--|---------------|
| AGRADECIMIENTOS | 8 |
| 1. RESUMEN | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN | |
| Vía de señalización mediada por los ligandos Wnt y rol de β -catenina..... | 11 |
| Estructura de β -catenina y sus dominios funcionales..... | 14 |
| Mutaciones encontradas en β -catenina..... | 15 |
| 3. HIPÓTESIS | 17 |
| 4. OBJETIVOS | 17 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| Obtención de las muestras..... | 18 |
| Recolección de la información..... | 18 |
| Extracción del DNA a partir de biopsias de colon..... | 20 |
| Extracción del RNA a partir de biopsias de colon..... | 21 |
| Amplificación de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina por PCR a partir de DNA genómico de las biopsias de colon..... | 22 |
| Secuenciación y análisis bioinformático..... | 25 |
| 6. RESULTADOS | |
| Extracción de DNA genómico a partir de las biopsias de colon..... | 26 |
| Extracción de RNA a partir de las biopsias de colon..... | 27 |
| Amplificación de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina por PCR a partir de DNA genómico de las biopsias de colon..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Análisis de electroforetogramas de la secuenciación de los exones 12 y 13 de β -catenina a partir de DNA genómico..... | 29 |
| Análisis por alineamiento de las secuencias de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina a partir de DNA genómico..... | 33 |
| Amplificación del exón 12 del gen de β -catenina por PCR a partir de cDNA de las biopsias de colon..... | 36 |
| Análisis de electroforetogramas de secuenciación del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA..... | 37 |
| Análisis por alineamiento de las secuencias del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA..... | 39 |
| | |
| 7. DISCUSIÓN | |
| Cambios en el desarrollo de la investigación..... | 42 |
| Estrategias moleculares abordadas..... | 42 |
| Análisis crítico de resultados obtenidos..... | 43 |
| Proyecciones..... | 45 |
| | |
| 8. REFERENCIAS..... | 47 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Biopsias disponibles para el estudio..... | 19 |
| Tabla 2. Cuantificación de DNA genómico..... | 26 |
| Tabla 3. Cuantificación de RNA..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Rol central de β -catenina en la ruta Wnt-canónica y su regulación por diversas proteínas kinasas..... | 13 |
| Figura 2. Estructura de β -catenina..... | 15 |
| Figura 3. Secuencia analizada del gen de β -catenina (<i>CTNNB1</i>)..... | 23 |
| Figura 4. Secuencia analizada del cDNA del gen de β -catenina (<i>CTNNB1</i>)..... | 24 |
| Figura 5. Electroforesis de DNA genómico de biopsias de colon..... | 27 |
| Figura 6. Análisis mediante electroforesis de RNA total extraído de biopsias de colon..... | 28 |
| Figura 7. Amplificación por PCR de los exones 12 y 13 de β -catenina a partir de DNA genómico..... | 29 |
| Figura 8. Electroforetogramas de la secuenciación de los exones 12 y 13 de β -catenina..... | 30 |
| Figura 9. Validación de la secuencia por comparación entre hebras sentido y antisentido..... | 31 |
| Figura 10. Análisis de hebras antisentido..... | 32 |
| Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de exones 12 y 13 del gen de β -catenina..... | 33 |
| Figura 12. Validación de la secuencia por comparación con la secuencia de la base de datos del NCBI..... | 34 |
| Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de exones 12 y 13 del gen de β -catenina..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Amplificación por PCR del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA..... | 36 |
| Figura 15. Electroforetogramas de la secuenciación del exón 12 de β -catenina.. | 37 |
| Figura 16. Validación de la secuencia por comparación entre hebras sentido y antisentido..... | 38 |
| Figura 17. Validación de la secuencia por comparación con la secuencia de la base de datos del NCBI..... | 39 |
| Figura 18. Alineamiento múltiple de las secuencias del exón 12 del gen β -catenina | 40 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| APC | Adenomatous poliposis coli |
| ARM | motivo armadillo |
| Akt/PKB | thymoma viral protooncogene |
| Blast | Basic Local Alignment Search Tool |
| cDNA | DNA complementario |
| CK1 α | caseína kinasa 1 α |
| CK2 | caseína kinasa 2 |
| <i>CTNNB1</i> | gen de β -catenina |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| dNTPs | desoxinucleótidos |
| Dvl | Dishevelled |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| GSK3 β | glicógeno sintasa kinasa 3 β |
| HEPES | N(2 hidroxietilpiperazina-N(2 etansulfónico) |
| HNPCC | <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> |
| JNK2 | c-Jun N-terminal kinase 2 |
| LRP5/6 | Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 /6 |
| MCR | <i>Mutation Cluster Region</i> |
| MOPS | 3-(N-morpholino) ácido propanosulfónico |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>PIK3C</i> | gen de Phosphatidilinositol 3-kinasa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAasa | Ribonucleasa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa desde RNA total |
| TBE | Tris/ borato/ EDTA |
| TCF/LEF | <i>T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer-binding Factor</i> |
| TNM | Tumor, Nodes and Metastases, sistema de estadio de cáncer |

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi tutor Dr. Julio Tapia y mi co-tutora Dra. Luisa Herrera, por su constante ayuda, sabios consejos, comprensión y calidad humana.

También quisiera expresar mi gratitud hacia la Dra. Cristina Fernández, por su colaboración y apoyo.

Por último, quisiera agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Transformación Celular (dirigido por el Dr. Julio Tapia) y del Laboratorio de Biología Celular y Molecular Óseo (dirigido por el Dr. Mario Galindo), por su amistad y apoyo en mi crecimiento intelectual y personal.

1. RESUMEN

La vía de señalización Wnt-canónica juega un rol central en la etiología del cáncer de colon. Esta vía de transducción de señales tiene como su factor clave a la proteína β -catenina, cuya concentración citoplasmática es fuertemente controlada por un proceso de degradación mediado por el proteosoma, con la participación del supresor de tumores APC (Adenomatous polyposis coli), la proteína de andamio Axina, y las enzimas glicógeno sintasa kinasa 3β (GSK 3β) y caseína kinasa 1α (CK 1α). A pesar de que varias porciones de β -catenina han sido ampliamente estudiadas en relación con la incidencia del cáncer colorrectal, la o las funciones de su dominio carboxilo-terminal no han sido mayormente exploradas. En dicha región existen algunos posibles sitios de fosforilación para diversas kinasas que podrían ser importantes en su regulación. La hipótesis que se planteó en esta tesis es que existen mutaciones en el extremo C-terminal de β -catenina en tumores presentes en pacientes con cáncer colorrectal. El objetivo general fue realizar un análisis genómico en biopsias de pacientes con cáncer de colon y normales para detectar la presencia de mutaciones en los exones 12 y 13, ambos parte del extremo C-terminal de β -catenina. Para comprobar esto se aisló DNA y RNA a partir de biopsias de colon normales y con cáncer, y se secuenció la región correspondiente a los exones 12 y 13 de β -catenina en productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico y cDNA. Luego de analizar los electroforetogramas y sus secuencias resultantes mediante herramientas de bioinformática, no se encontró mutaciones en ninguna de las 18 biopsias procesadas, ya sea en DNA genómico o cDNA. Estos resultados sugieren que la región carboxilo-terminal de β -catenina pareciera no ser un blanco de mutaciones que se puedan relacionar con la progresión del cáncer de colon.

2. INTRODUCCIÓN

La importancia del cáncer de colon recae en su alta incidencia en el mundo y en Chile, donde ocupa el tercer lugar entre todos los cánceres (Medina, Kaempffer 2001). En este tipo de cáncer el 70-75% de los casos se origina como un tumor esporádico, mientras que en el 20% existe historia familiar (Bannura, 2006). El cáncer de colon más frecuente es el no-polipósico hereditario o HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*).

Muchos cánceres involucran una reactivación inapropiada de la señalización mediada por la ruta Wnt-canónica, donde la proteína β -catenina tiene un rol fundamental (Polakis, 2000). En efecto, la sobreexpresión de ciertos ligandos Wnts, los cuales son normalmente secretados durante el desarrollo embrionario, conduce a la proliferación y transformación celular (Bhanot et al, 1996).

La vía Wnt-canónica tiene como componente principal a la proteína β -catenina, cuya concentración citoplasmática libre es fuertemente controlada por un proceso de degradación proteosomal, donde participan como efectores las proteínas APC, axina, GSK3 β y CK1 α (Doble et al, 2003; Zeng et al, 2005). Un estudio con pacientes que sufrían de adenocarcinomas de colon de estadio II demostró que la β -catenina nuclear es un marcador de pronóstico independiente en el cáncer de colon de estadio II (Horst et al, 2009)

Una variada cantidad de literatura ha demostrado que mutaciones en el gen supresor de tumores APC causan no sólo cáncer colorrectal sino que además otro tipo de patologías, como la Adenomatosis Poliposa Familiar (Kinzler et al, 1996). Se han encontrado mutaciones asociadas con cáncer de colon hereditario en los genes codificantes para APC, axina y en el dominio N-terminal de β -catenina (Munemitsu et al, 1995). Dichas mutaciones hacen a β -catenina refractaria a la degradación proteosomal, conduciendo a su disociación del complejo

y mayor estabilización (Li et al, 1999). Se ha visto que la mayoría de las mutaciones en APC tienen lugar en la región MCR (*Mutation Cluster Region*) donde se han encontrado cambios sin sentido y, en muchos casos, deleciones. En un estudio se observó que pacientes con tumores rectosigmoides y rectales presentaban con mayor frecuencia mutaciones sin sentido C-T y mutaciones de corrimiento de marco de lectura y de deleción en el gen de APC, en comparación con pacientes con tumores de colon distales y proximales (Luchtenborg et al, 2004). No obstante, en un subgrupo de cánceres que poseían APC no mutado, la activación de la señalización por β -catenina parecía deberse a mutaciones que volvían a la proteína insensible a la degradación mediada por APC/GSK3 β (Munemitsu et al, 1995; Morin et al, 1997; Rubinfeld et al, 1997; Munemitsu et al, 1996).

A nivel clínico, el cáncer colorrectal puede ser en gran parte prevenido por la detección y remoción de los pólipos adenomatosos, siendo la sobrevida significativamente mayor cuando el cáncer es diagnosticado mientras todavía está *in situ* (Levin et al, 2008). Esta neoplasia tiene una larga fase preclínica, lo cual favorece el tratamiento si las lesiones precursoras son detectadas precozmente. De ahí la importancia de desarrollar un método de diagnóstico precoz, de alta sensibilidad y especificidad que permita pesquisar eficientemente este tipo de cáncer en su fase preclínica. En la actualidad los métodos de chequeo que se utilizan en el país son el test de hemorragias ocultas, la sigmoidoscopia, la colonoscopia y sus combinaciones (Bannura, 2006).

Vía de señalización mediada por los ligandos Wnt y rol de β -catenina.

La señalización mediada por los ligandos Wnt comienza cuando éstos se unen a receptores de la familia “Frizzled”, de siete dominios de transmembrana, y su co-receptor

LRP5/6 (Bhanot et al, 1996; Yang et al, 1996). Esta interacción provoca el reclutamiento de proteínas de la familia “dishevelled” (Dvl en humanos o Dsh en murinos), los cuales son intermediarios proximales que inhiben a la enzima GSK3 β (Yanagawa et al, 1995).

La proteína kinasa GSK3 β es parte de un “complejo regulador negativo” en la ruta de señalización Wnt-canónica (Figura 1), puesto que en ausencia de una señal Wnt esta enzima fosforila a β -catenina e induce su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal (Wagner et al, 1997). Este complejo está formado también por APC, axina y Frat1, el cual regula la frecuencia de ubiquitinación y degradación de β -catenina (Li et al, 1999).

La inhibición de GSK3 β , debido a la presencia de una señal de Wnt, produce la estabilización de β -catenina y posteriormente su translocación al núcleo, donde actúa como un cofactor esencial para la actividad de los factores de transcripción de la familia TCF/LEF (*T-Cell Factor/Lymphocyte Enhancer-binding Factor*) (Molenaar et al, 1996). El complejo transcripcional bipartito β -catenina-TCF/LEF regula positivamente la expresión de muchos genes, tales como *c-myc*, *ciclina-D1*, *survivina* y *cox-2*, los cuales en su mayoría están relacionados con proliferación, resistencia a la apoptosis y, consecuentemente, con progresión tumoral (Nusse & Willert, 1998; Tapia et al. 2006).

Se ha planteado recientemente que existiría en el citoplasma un “complejo regulador positivo” que promovería la estabilización de β -catenina, formado entre otros por Dvl y como elemento central la proteína kinasa CK2 (Song et al, 2000). Este complejo sería también activado por la señalización de Wnt y, en consecuencia, la inhibición de CK2 desestabilizaría marcadamente a β -catenina y Dvl, bloqueando la proliferación celular (Song et al, 2000). Al respecto, se sabe que β -catenina traducida *in vitro* es fosforilada por CK2 y es esencial para la mantención de los niveles de β -catenina y Dvl en células de epitelio mamario (Song et al,

2000). Estudios experimentales apoyan esta hipótesis, puesto que el tratamiento de células epiteliales mamarias con apigenina (inhibidor de CK2) reduce la actividad de esta kinasa y acelera dramáticamente la degradación de β -catenina y Dvl (Song et al, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que la subunidad catalítica CK2 α promueve la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF a través de un mecanismo que requiere la actividad enzimática de esta kinasa (Tapia et al, 2006).

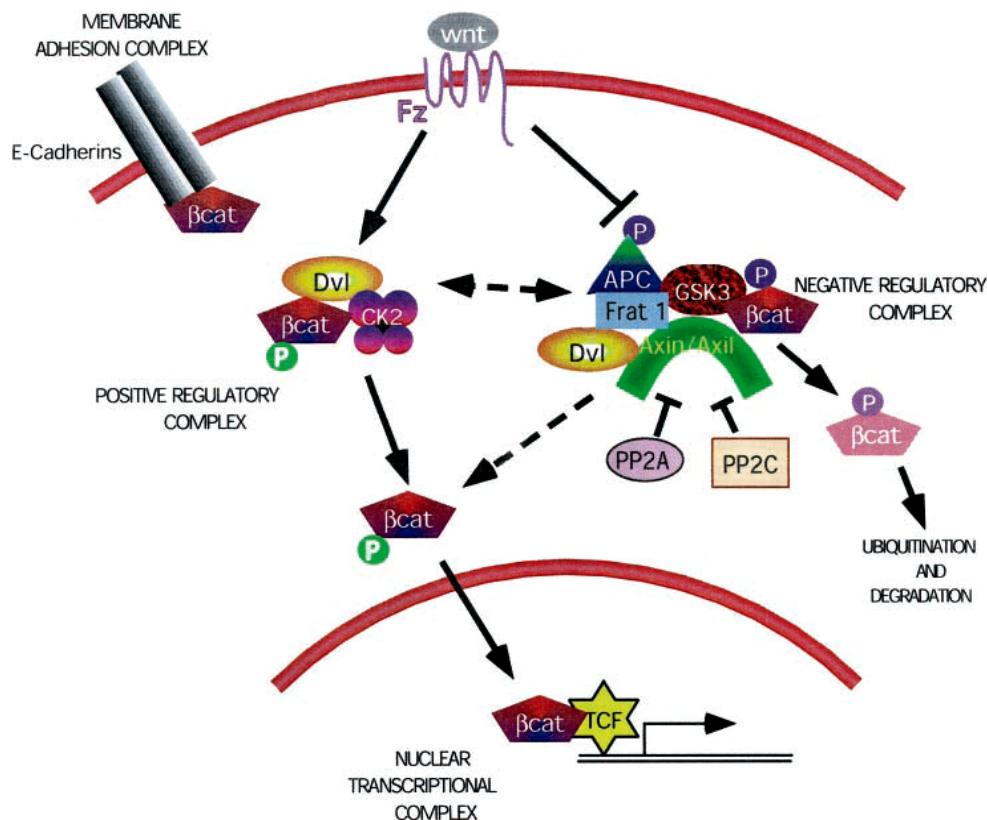


Figura 1. Rol central de β -catenina en la ruta Wnt-canónica y su regulación por diversas proteínas quinasas. La unión de un ligando Wnt a un receptor de transmembrana frizzled inicia la cascada de señales Wnt. Esta interacción activa a la Dvl y CK2 que impediría la fosforilación de β -catenina por el complejo de degradación (GSK3 β , APC y axina). En consecuencia, β -catenina se acumula en el citoplasma y es translocada al núcleo donde interactúa con Lef/Tcf formado un complejo capaz de estimular la transcripción de genes involucrados en tumorigénesis. En cambio, cuando no existe una señal Wnt, β -catenina es mantenida en bajas concentraciones por acción del complejo de degradación negativo formado por axina y APC, los cuales se unen a β -catenina y facilitan su fosforilación por CK1, GSK3 β , lo que la marca para ser ubiquitinada y finalmente ser degradada por el proteosoma (Song et al, 2000).

En síntesis, en ausencia de estimulación por Wnt el complejo regulador negativo destinaría a β -catenina para su degradación en el proteosoma, resultando en niveles citoplasmáticos bajos y el factor transcripcional TCF/LEF inactivado. En cambio, cuando algún ligando Wnt se une al receptor Frizzled y su co-receptor LRP5/6, la proteína Dvl es reclutada a la membrana y a su vez a axina, inhibiendo de esta forma al complejo regulador negativo. Esta inhibición junto con el efecto del complejo regulador positivo determinan la acumulación citoplasmática de β -catenina y su translocación al núcleo, donde se une a TCF/LEF para transactivar genes blancos de la ruta Wnt-canónica (Song et al, 2000).

Por lo tanto, la compleja regulación de β -catenina explica que la estabilización de sus niveles citoplasmáticos - debido a la sobreexpresión de algún ligando o mutaciones en β -catenina, APC o axina - pueda causar tumorigénesis en humanos y modelos animales (Song et al, 2000). Asimismo, algunos tumores podrían también originarse por regulación de la expresión y/o actividad de varias proteínas kinasas involucradas en la ruta Wnt-canónica, como GSK3 β (Song et al, 2000), CK2 (Tapia et al, 2006) o Akt/PKB (Fang et al, 2007).

Estructura de β -catenina y sus dominios funcionales.

La proteína β -catenina está compuesta por tres dominios principales: uno N-terminal, uno central denominado ARM (formado por 12 repeticiones del motivo “armadillo”) y otro C-terminal (Hoover, 2008) (Figura 2). El dominio N-terminal ha sido el más estudiado, puesto que posee residuos involucrados en la estabilidad de β -catenina (Hoover, 2008). En este dominio se han descrito varios sitios blancos de fosforilación, algunos de los cuales se encuentran mutados en ciertos tumores. En cambio, el dominio central ARM pareciera estar relacionado con la salida o exportación nuclear de β -catenina, donde la proteína APC cumple un rol fundamental (Sierra et al, 2006). Finalmente, el dominio C-terminal es el menos

estudiado y pareciera estar implicado en la función transcripcional de β -catenina (Bustos et al, 2006). Además, este dominio contiene varios sitios putativos de fosforilación para diversas kinasas, siendo una de ellas la proteína quinasa CK2 (Song et al, 2003; Litchfield, 2003).

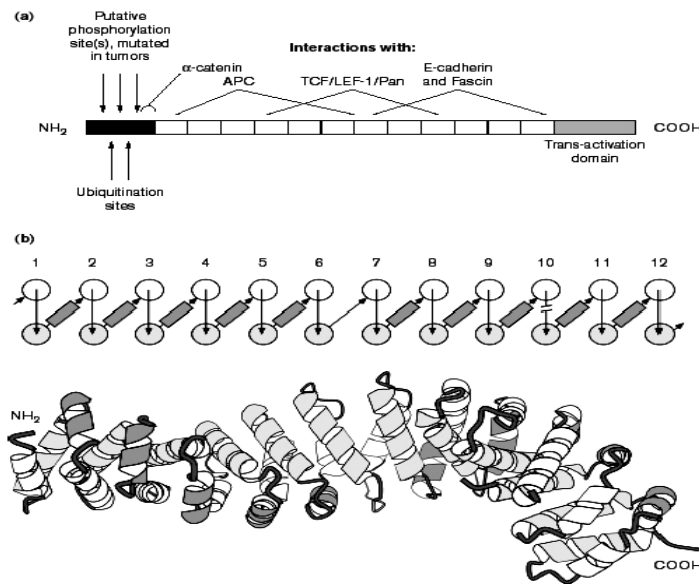


Figura 2. Estructura de β -catenina. (a) Esquema de la estructura primaria de β -catenina, donde se muestra: el dominio N-terminal (negro); el dominio central ARM (blanco), que interactúa con APC, Tcf, E-cadherina y fascina; y el dominio de transactivación (gris). (b) Topología (arriba) y estructura en cinta (abajo) de los 12 motivos armadillo, donde los círculos y rectángulos son α -hélices vistas desde arriba y el lado (Nusse et al, 1998).

Mutaciones encontradas en β -catenina.

Dentro de los carcinomas de colon con expresión de APC no mutado, un 15% de ellos presentan mutaciones puntuales en β -catenina en alguno de los cuatro residuos de serina/treonina de su dominio N-terminal, los cuales son el blanco de fosforilación por GSK3 β (Morin et al, 1997). Estas mutaciones vuelven a β -catenina refractaria a la destrucción por el complejo regulador negativo e, interesantemente, cambios similares se han detectado en otros

tipos de tumores como melanoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular y tumores del folículo piloso (Rubinfeld et al, 1997; Polakis, 2000). Por otro lado, análisis del dominio N-terminal de β -catenina han identificado mutaciones activadoras en cinco tipos de cáncer colorrectal deficientes en mutaciones de APC (Morin et al, 1997) y en una pequeña proporción de pacientes con cáncer colorrectal no tipificado (Ilyas et al, 1997).

Por el contrario, el dominio C-terminal no ha sido estudiado en cuanto a su relación con la incidencia de cáncer colorrectal. En un trabajo se ensayaron fragmentos de β -catenina con su dominio C-terminal truncado como sustratos *in vitro* de la proteína kinasa CK1. Se encontró que la remoción del segmento C-terminal completo y todo el dominio ARM menos el primer motivo armadillo dan cuenta del tamaño mínimo de β -catenina susceptible de sufrir fosforilación por esta enzima (Bustos et al, 2006). Asimismo, un estudio *in vivo* de mutaciones en el dominio C-terminal de β -catenina mostró que los residuos Ser-191 y Ser-605 son los sitios de fosforilación predominantes por la kinasa JNK2 en respuesta a una señal Wnt en la línea celular ST2 de estroma derivado de médula ósea de ratón (Wu et al, 2008).

Por lo tanto, hasta ahora los estudios de β -catenina y su relación con la progresión del cáncer colorrectal se han centrado principalmente en los dominios N-terminal y ARM, pero el papel del dominio C-terminal aún no se esclarece ni tampoco se conoce si tiene una función en la localización subcelular o en la actividad transcripcional de β -catenina.

Esta tesis se enfocará en la búsqueda de mutaciones en los exones 12 y 13 del gen de β -catenina, debido a que en ese exón se han descrito dos posibles sitios blanco de fosforilación por la proteína kinasa CK2, Ser-605 y Ser-646, además de contener al menos un sitio importante involucrado en la respuesta a una señal Wnt, Ser-605, en células ST2 de ratón (Wu et al, 2008).

3. HIPÓTESIS

Considerando los antecedentes anteriores, se propone la siguiente hipótesis para esta tesis:

Existen mutaciones en el extremo carboxilo-terminal de β -catenina en tumores de pacientes con cáncer colorrectal

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Realizar un análisis genómico en biopsias de pacientes con cáncer de colon y normales para detectar la presencia de mutaciones en los exones 12 y 13, correspondiente al extremo carboxilo-terminal de β -catenina.

Objetivos Específicos:

1. Aislar el DNA genómico, RNA y preparar cDNA desde 18 biopsias de pacientes con cáncer de colon y normales;
2. Amplificar por PCR los exones 12-13 y secuencias aledañas del gen de β -catenina (*CTNNB1* en notación base de datos NCBI) desde el DNA genómico y el cDNA preparado de las biopsias;
3. Secuenciar los productos de PCR de la región correspondiente a los exones 12-13 y secuencias aledañas del gen de β -catenina de las biopsias;
4. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, mediante el uso de las herramientas Clustal W2 y “Blast 2 sequences” (Tatusova et al, 1999); y
5. Correlacionar las mutaciones encontradas en los exones 12-13 del gen de β -catenina con la progresión tumoral.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras.

Las biopsias de pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal (Tabla 1) provienen del Banco de Tejidos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, evaluadas bajo la asesoría de la Dra. Cristina Fernández F., Jefe Técnica del Banco. Estas biopsias se han obtenido siguiendo los protocolos éticos y de preservación de tejidos apegados a las normas internacionales, que garantizan la preservación de tejidos neoplásicos y no neoplásicos con integridad celular (DNA y proteínas, con posibilidad de recuperar RNA) para estudios moleculares y genéticos.

Recolección de la información.

Los tejidos en estudio han sido evaluados por un patólogo que toma muestras representativas de la neoplasia (extraída quirúrgicamente de los pacientes con fines curativos o paliativos) bajo protocolos que garantizan la integridad del DNA. Se han archivado en un congelador a -80°C , previa asignación de un número interno que garantiza la confidencialidad de la información. En una base de datos se archiva además los consentimientos informados de los pacientes y la información clínica, incluyendo la clasificación de tumores malignos, estadio tumoral (TNM), datos epidemiológicos y los marcadores histológicos de pronóstico de la muestra (Tabla 1).

Tabla 1: Biopsias disponibles para el estudio.

| Número interno | Condición | Estadio tumoral |
|----------------|-----------|-----------------|
| 215A | tumoral | |
| 215B | normal | |
| 252A | tumoral | |
| 252B | normal | |
| 253A | tumoral | |
| 259A | tumoral | pT3N0* |
| 259B | normal | |
| 326A | tumoral | pT3N0* |
| 334A | tumoral | Grupo II** |
| 334B | normal | |
| 335A | tumoral | |
| 335B | normal | |
| 356A | tumoral | |
| 370A | tumoral | |
| 394A | tumoral | |
| 394B | normal | |
| 425A | tumoral | pT4N0* |
| 425B | normal | |

*Clasificación TNM; ** Clasificación Jass

Extracción del DNA a partir de biopsias de colon.

Homogenización del tejido. Las muestras de tejido congelado luego de la cirugía se conservaron a -80°C y desde ese depósito fue seccionado un fragmento del tejido y sumergido en 1 mL de Trizol reagent (*Invitrogen*), transportado en Labtop *Nalgene* cooler jr. y vuelto a congelar a -80°C . Estos fragmentos se homogenizaron con un homogenizador de vidrio marca *Tri R* instruments.

Separación de fases. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos núcleo proteicos. Luego se agregó 200 μL de cloroformo y se agitó los tubos vigorosamente por 15 segundos y se incubaron 2 minutos a 37°C . Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R microcentrifuge y la mezcla se separó en una fase inferior fenólica (roja) y una fase superior clorofórmica que contiene el RNA.

Precipitación del DNA. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio para la extracción de RNA y se guardó la fase orgánica para aislamiento de DNA. Se removió la fase acuosa sobre la interfase, se agregó 300 μL de etanol 100%, se mezcló la muestra por inversión. Luego se dejó incubando las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugaron a 2000x g por 5 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R microcentrifuge.

Lavado del DNA. Se removió el sobrenadante de fenol-etanol se lavó el sedimento dos veces con 1 mL de una solución de citrato de sodio 0,1 M en etanol 10%, se dejó incubando el sedimento con agitación periódica en la solución por 30 minutos a temperatura ambiente al cabo de los cuales se centrifugó a 2000g por 5 minutos a 4°C . Se resuspendió el DNA en etanol 75% y se mantuvo en él durante 20 minutos a temperatura ambiente luego se centrifugó a 2000 g por 5 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R microcentrifuge.

Redisolución del DNA. Se secó el DNA por 15 minutos a temperatura ambiente en un tubo abierto y luego se disolvió en NaOH 8mM. El pH de la solución se ajustó con HEPES.

Cuantificación del DNA. La cuantificación del DNA se llevó a cabo con el kit comercial Quant-iT dsDNA BR Assay Kit en el fluorímetro Qubit de *Invitrogen*.

Evaluación de la integridad del DNA. La integridad del DNA se evaluó por un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris, ácido bórico, EDTA 0,5 M pH 8.0) con bromuro de etidio. Se utilizó tampón de carga *Fermentas* en relación 1:6 con respecto al volumen de la muestra y 5 µL de marcador de tamaño molecular DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III de *Invitrogen*. El gel se corrió aproximadamente 30 minutos a 100 volt en tampón de corrida TBE 1X y el DNA se observó por exposición del gel sobre el transiluminador UV Vilber-Lourmat.

Extracción del RNA a partir de biopsias de colon.

Precipitación del RNA. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se guardó la fase orgánica para aislamiento de DNA. Se agregó 500 µL de alcohol isopropílico, se incubaron las muestras a -20°C por una hora mínimo, se centrifugaron las muestras a 12000 g por 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R microcentrifuge.

Lavado del RNA. Se removió el sobrenadante, se lavó el pellet de RNA una vez con 1 mL de etanol 75%, se mezcló por vortex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R microcentrifuge.

Redisolución del RNA. Se secó el sedimento de RNA a temperatura ambiente con el tubo abierto y se disolvió en agua tratada con DEPC. Se almacenó a -80°C.

Cuantificación del RNA. Se cuantificó la concentración con el kit Quant-iT RNA BR Assay Kit de *Invitrogen* en el fluorímetro Qubit.

Electroforesis en gel de agarosa conteniendo formaldehído. Para analizar la integridad del RNA se preparó un gel de agarosa al 1% en 36,1 mL de agua DEPC con tampón 5mL MOPS 10X (MOPS, acetato de sodio, EDTA) conteniendo 8,9 mL de formaldehído al 37%. Se utilizó tampón de carga (40 µL de MOPS 10X, 75 µL de formaldehído al 37%, 200 µL de formamida 45,04 g/mol, 60 µL de Dye, 25 µL de bromuro de etidio 0,5µg/mL) en relación 1:6 respecto al volumen de la muestra. El buffer de corrida fue MOPS 1X con agua DEPC. Posteriormente se evaluó la integridad del RNA observando el gel por exposición a luz UV en transiluminador Vilber-Lourmat.

Síntesis del cDNA. El cDNA de las biopsias se obtuvo mediante el método de transcripción reversa. Para la denaturación del RNA, 3µg de RNA en 25 µL de agua DEPC se incubaron con 1,5 µL de random primer en concentración 1 µg/µL a 70°C por 5 minutos en un volumen de 17 µL. Posteriormente se colocaron los tubos en hielo y se agregaron 5 µL de buffer 5X, 1,25 µL de dNTPs 10mM , 0,63 µL de inhibidor de RNAasa 40 U/µL y 1 µL de enzima RT (M-MLV) 200 U/µL (*Invitrogen*) y entonces los tubos se incubaron a 37°C por 60 minutos y luego 10 minutos a 90°C.

Amplificación por PCR de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina.

Desde DNA genómico extraído de biopsias de colon. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizó como plantillas el DNA genómico de biopsias de colon y primers gen específicos que amplificaban los exones 12 y 13, además de las secuencias adyacentes. El tamaño del producto de PCR es de 580 pares de bases y el total de residuos incluidos en esta secuencia

es de 90 aminoácidos (Figura 3). Este segmento abarca la secuencia aminoacídica desde Leu-602 hasta Glu-692, lo que incluye las serinas 605 y 646, posibles blancos de fosforilación por la proteína kinasa CK2 y, en el caso de Ser-605, sustrato de la enzima JNK2 (Wu et al, 2008).

A

```

AATATTATTTACTACAGTGTGAATGCCTCTTGCACCTCTGAATTGGGAATGTTTGCACCACAGTGGGGGGCTTGCCA
TGTTTTAGCTTTAGATTTAATTAGGTTTTGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATCC
AAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGC
CACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTTTAGC
AGATGTGTACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTCTCCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCT
GTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCT
TCAGAACAGAGCCAATGGCTTGGGAATGAGGTAGGGAAATGTGAGCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCCTAGAGCAGG
TATGGCAGCTTGTTCTTTCTCTCAAAACACTTAGTACACATTCATTTGCATTGATGTTTCCCTGGCTTGAGTATT
TCTTCTTTATGCTGTCTAGCAACTGCTCTGAGGAAGAAGCTATAATACAAGCTTTAAAGAGTCTGTTTCAGAATCATT
ACAAATAAGTTGTGTTATTTAAATTATAATTCATA

```

Exón 12

Exón 13

B

Partidor sentido 5'-CCTCTTGCACCTCTGAATTGG-3'
 Partidor antisentido 5'-ACTCAAGCCAGGGAAACATC-3'

Figura 3. Secuencia analizada del gen de β -catenina (*CTNNB1*). La parte A de la figura representa parte del gen *CTNNB1* que incluye los exones 12 y 13. En amarillo se destaca la secuencia a la cual estaban dirigidos los partidores utilizados en la amplificación, en celeste la secuencia del exón 12 y en rosado la secuencia del exón 13, en rojo los codones que codifican las serinas 605 y 646. En B se indican las secuencias de los partidores.

La amplificación se realizó mediante el protocolo de PCR Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (11304-011, *Invitrogen*), utilizando un volumen final de reacción de 50 μ l conteniendo 5 μ l de Buffer PCR 10x High Fidelity, 0,6 μ l de la mezcla de dNTP 10 mM, 1 μ l de MgSO₄ 50 mM, 1,5 μ l del mix de primers, 0,4 μ l de Platinum® *Taq* High Fidelity y aproximadamente 60 ng de templado. El programa de PCR utilizado para amplificar los exones 12 y 13 de β -catenina fue el siguiente: 5 minutos a 94° C (denaturación), seguido de 42 ciclos de: 1 minuto a 94° C, 45 segundos a 63° C (apareamiento), 50 segundos a 68° C (extensión) y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 68° C (extensión final).

Desde cDNA preparado de RNA extraído de biopsias de colon. Las serinas 605 y 646 también fueron analizadas con partidores gen-específico que amplificaban el exón 12 de β -catenina. El tamaño del producto de PCR es de 360 pb (Figura 4). Esta amplificación se realizó mediante el protocolo de PCR Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (11304-011, Invitrogen), utilizando un volumen final de reacción de 50 μ l conteniendo 5 μ l de Buffer PCR 10x High Fidelity, 0,6 μ l de la mezcla de dNTP 10 mM, 1 μ l de MgSO₄ 50 mM, 1,5 μ l del mix de primers, 0,4 μ l de Platinum® *Taq* High Fidelity y aproximadamente 60 ng de templado. Se utilizó el mismo programa de PCR con el que se amplificó el DNA genómico.

A

GAAGGTTGTACCGGAGCCCTTCACATCCTAGCTCGGGATGTTTACAACCGAATTGTTATCAGAGGACTAAATACCA
 TTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAACT
 TGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTCT
 AGGAATGAAGGTGTGGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTACAAGA
 AACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCTCTCTCTTCA GAACAGAGCCAATGGCTTGG
 Exón 12

B

Partidor sentido 5'-GAAGGTTGTACCGGAGCCCT-3'
 Partidor antisentido 5'-CCAAGCCATTGGCTCTGTTC-3'

Figura 4. Secuencia analizada del cDNA del gen de β -catenina (*CTNNB1*). La parte A de la figura representa parte del cDNA que incluye el exón 12 (celeste). En amarillo se destaca la secuencia a la cual estaban dirigidos los partidores utilizados en la amplificación y en rojo los codones que codifican las serinas 605 y 646. En B se indican las secuencias de los partidores.

Secuenciación y análisis bioinformático.

Los productos de PCR sin purificar fueron enviados para su secuenciación a la empresa biotecnológica Macrogen (Seoul, Korea). Para la secuenciación, esta empresa utiliza un secuenciador capilar 3730xl DNA (Applied Biosystem, Foster city, USA). Los resultados, graficados como electroforetogramas, fueron analizados visualmente utilizando el programa Chromas Lite 2.01 para evaluar la calidad de la secuenciación y para detectar posibles mutaciones heterocigotos. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia normal del gen (NCBI). Esta comparación se realizó utilizando las herramientas bioinformáticas “Blast 2 sequences” disponible en la página web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi> y la herramienta clustal W, disponible en la página web <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

6. RESULTADOS.

Extracción de DNA genómico a partir de las biopsias de colon.

Se extrajo DNA genómico a partir de las 18 biopsias de colon, luego se procedió a cuantificarlo (Tabla 2) y evaluar su integridad (Figura 5) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 2: Cuantificación de DNA genómico.

| Número interno | DNA (ng/ μ L) |
|----------------|-------------------|
| 215A | 3,1 |
| 215B | 4,9 |
| 252A | 56,0 |
| 252B | 23,1 |
| 253A | 4,31 |
| 259A | 72,6 |
| 259B | 3,6 |
| 326A | 29,3 |
| 334A | 2,3 |
| 334B | 3,7 |
| 335A | 12,6 |
| 335B | 3,1 |
| 356A | 8,2 |
| 370A | 6,6 |
| 394A | 36,4 |
| 394B | 5,8 |
| 425A | 4,7 |
| 425B | 31,9 |

En la figura 5 se muestra un ejemplo representativo de la integridad del DNA genómico obtenido a partir de las biopsias de colon. Como se observa, las muestras analizadas en los carriles 1 y 2 presentan un DNA de alto peso molecular, íntegro, no se observan contaminaciones ni degradación del mismo, según se puede comparar con el estándar de tamaño molecular DNA del fago λ digerido por la enzima de restricción Hind III (carril 3).

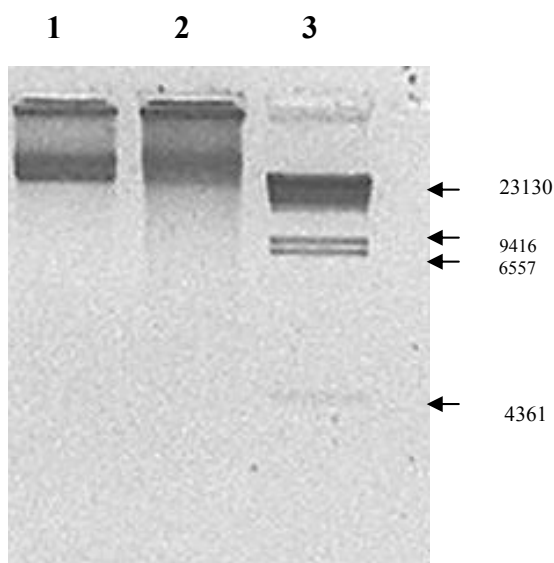


Figura 5. Electroforesis de DNA genómico de biopsias de colon. La figura muestra dos DNAs genómicos analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los carriles 1 y 2 muestran distintas biopsias de colon, el carril 3 corresponde a 250 ng del estándar de tamaño molecular del DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III. Las flechas indican el tamaño molecular de los fragmentos del estándar de tamaño molecular.

Extracción de RNA a partir de las biopsias de colon.

Con el objetivo de confirmar los resultados que se encontraran en el DNA genómico se extrajo RNA a partir de las biopsias de colon para producir cDNA. Se procedió a cuantificarlo (Tabla 3) y evaluar integridad (Figura 6) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 3: Cuantificación de RNA.

| Número interno | RNA (ng/ μ L) |
|----------------|-------------------|
| C252A | 874 |
| C252B | 805 |
| C259A | 552 |
| C259B | 470 |
| C334A | 116 |
| C334B | 360 |
| C335A | 440 |
| C335B | 473 |
| C425A | 159 |
| C425B | 470 |

En la evaluación de la integridad del RNA obtenido a partir de las biopsias de colon por electroforesis en agarosa conteniendo formaldehído (Figura 6) se observó normalmente dos bandas correspondientes a RNA ribosomal de tamaños 18S y 28S, aunque en algunos casos se observó degradación de RNA como se puede observar en el carril 2 de la Figura 6.

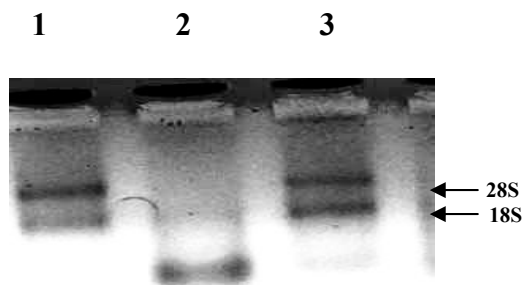


Figura 6. Análisis mediante electroforesis de RNA total extraído de biopsias de colon. Los RNAs totales fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a RNA ribosomal de distintas biopsias. Las flechas indican RNA ribosomal 18S y 28S.

Amplificación de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina por PCR a partir de DNA genómico de las biopsias de colon.

En la amplificación de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina se utilizó DNA genómico a partir de las biopsias de colon, según el procedimiento detallado en la sección de Materiales y Métodos. En la figura 7 se presenta una electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR. En estas condiciones de reacción se obtiene una banda única de 580 pb que corresponde al tamaño esperado.

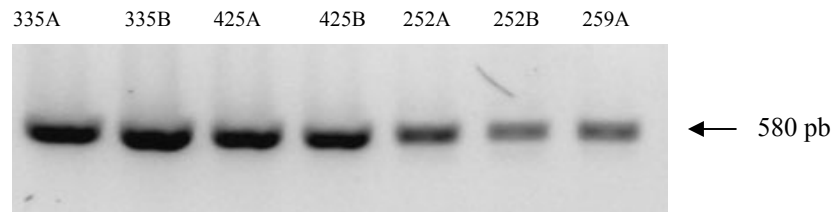


Figura 7. Amplificación por PCR de los exones 12 y 13 de β -catenina a partir de DNA genómico. La figura muestra los productos de amplificación por PCR obtenidos a partir de 7 muestras diferentes y analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En cada carril se indica el número de identificación de la biopsia. La flecha indica el tamaño molecular del producto de PCR.

Análisis de electroforetogramas de la secuenciación de los exones 12 y 13 de β -catenina a partir de DNA genómico.

Los productos de PCR fueron secuenciados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados, graficados como electroforetogramas, fueron analizados utilizando el programa Chromas Lite 2.01. En la figura 8 se muestra un electroforetograma donde cada color representa una base nucleotídica. En la parte superior de cada electroforetograma se muestra la secuencia deducida por el programa. En los casos en que se detectó una inserción o mutación en la secuencia de una hebra (se indica con un círculo en la figura). En todos los casos se realizó la secuenciación de la hebra sentido y antisentido.

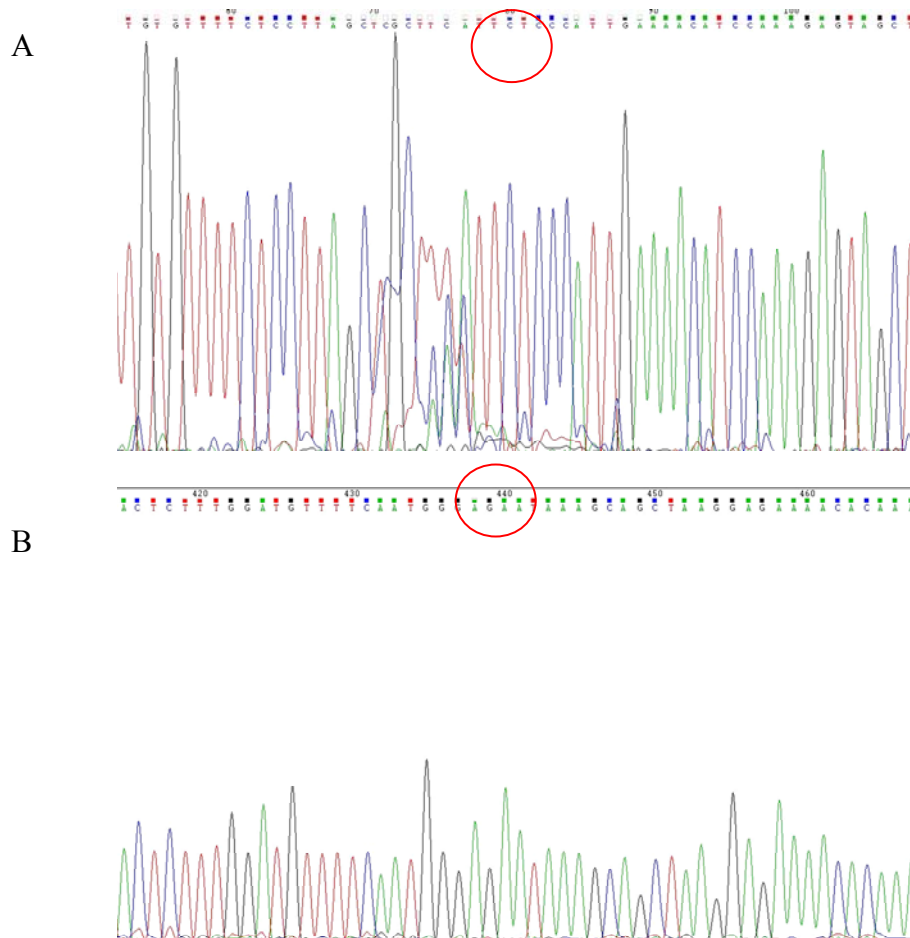


Figura 8. Electroforetogramas de la secuenciación de los exones 12 y 13 de β -catenina. En la parte A de la figura se observa el electroforetograma de la hebra sentido y en B el electroforetograma de la hebra antisentido. En un círculo rojo se presenta la serina 605 en la hebra sentido (A) y en la hebra antisentido (B) del producto de PCR de la biopsia G425A. Existe identidad entre ambas hebras.

En el análisis de los codones codificantes para las serinas 605 y 646, no se hallaron mutaciones. Esto se demostró por la identidad observada entre la secuenciación de la hebra sentido y antisentido del producto de PCR obtenido del DNA genómico de biopsias de colon, secuencias obtenidas de tejidos normales y tumorales y la secuencia del gen obtenida de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

En muchas de las secuencias analizadas, como se muestra en la figura 9, se observaron problemas en la secuenciación de la hebra sentido. Estos problemas incluyen la sobreposición de varios picos correspondientes a dos o tres nucleótidos distintos en parte o la totalidad de la

secuencia. De hecho, en muchos casos la secuencia obtenida a partir de la hebra sentido se diferenciaba de la secuencia del gen obtenida de la base de datos del NCBI. En cambio, la secuencia de la hebra antisentido siempre se observó limpia y concordaba perfectamente con la secuencia del gen obtenida de la base de datos del NCBI. Esto sugiere que en la secuenciación de la hebra sentido hubo problemas técnicos que hacían difícil y poco creíble el análisis. Por lo tanto, se privilegió el análisis de los resultados de la hebra antisentido de cada biopsia.

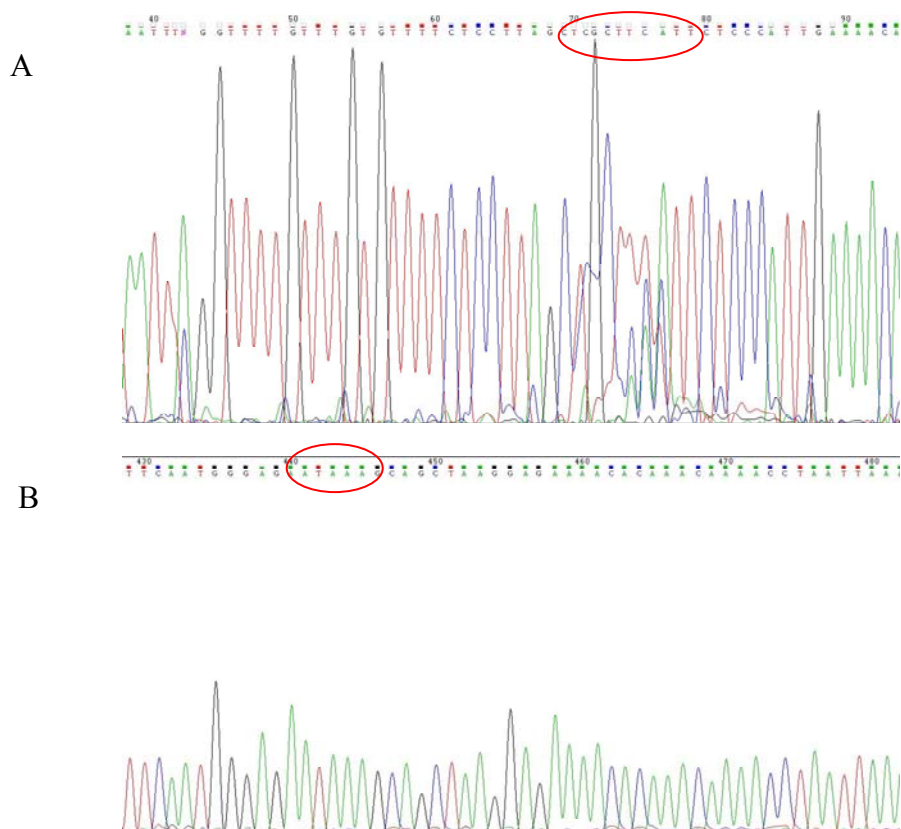


Figura 9. Validación de la secuencia por comparación entre hebras sentido y antisentido. En A se muestra la secuencia de la hebra sentido donde se observa la inserción de una citosina en la posición 71 y la transición de una timina por una citosina en la posición 76. En B se muestra la secuencia de la hebra antisentido donde estos cambios no se presentan.

Como se mencionó anteriormente, se decidió analizar las secuencias de las hebras antisentido por ser secuencias limpias. Al comparar las secuencias obtenidas en la hebra

antisentido con la secuencias de referencia (NCBI) se comprobó la identidad completa en la mayoría de los casos. Sólo se detectaron dos discrepancias que correspondieron a artefactos técnicos producidos en la secuenciación, los que se destacan con un círculo rojo en la Figura 10.

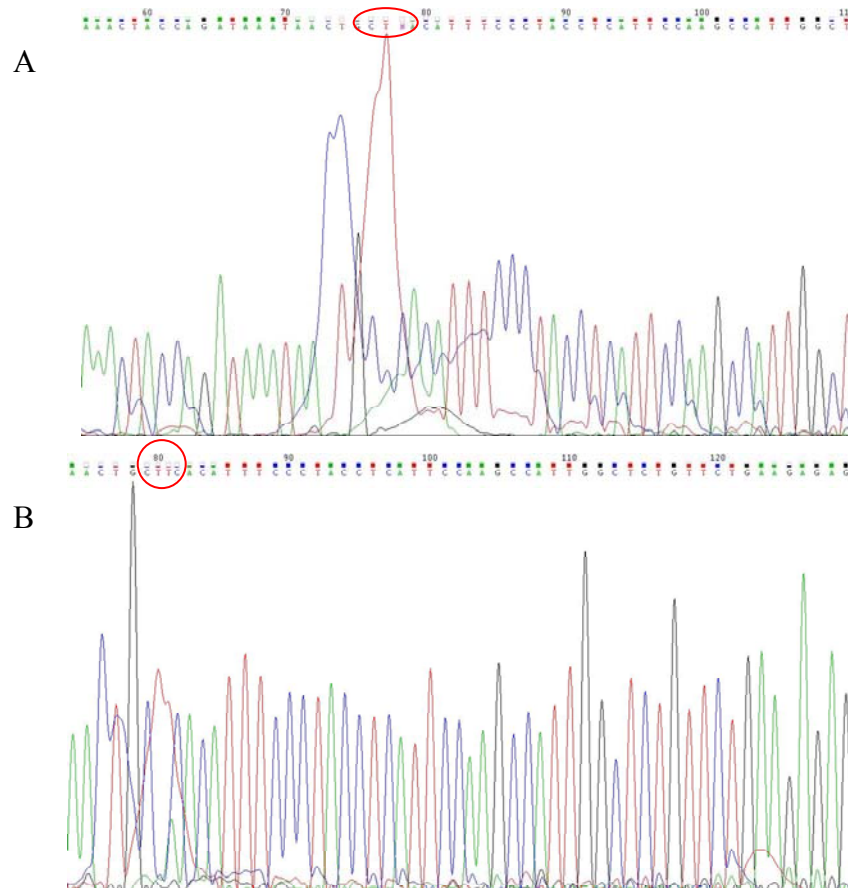


Figura 10. Análisis de hebras antisentido. En A se muestra la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia G252B donde se observa una N en la posición 78. En B se muestra la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia G335A donde se observa un pico extraño de timina que se sobrelapa con varios nucleótidos generando una secuencia anómala.

Análisis por alineamiento de las secuencias de los exones 12 y 13 del gen de β -catenina a partir de DNA genómico.

Las secuencias obtenidas para cada biopsia se compararon entre ellas y con la secuencia del gen en la base de datos NCBI mediante la utilización del programa ClustalW obtenido de internet, como se describe en la sección de Materiales y Métodos (Figura 11).

```
090616-R1_M06_G252A-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCATTGAAAACAT 49
090616-R1_O06_G252B-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GTTTATTCTCCATTGAAAACAT 49
090616-R1_I07_G259A-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCATTGAAAACAT 49
090616-10_N09_G335A-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCATTGAAAACAT 49
090616-10_J11_G425B-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCATTGAAAACAT 49
090616-10_F11_G425A-catafrw.ab      TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCTCGCTTCATTCTCCATTGAAAACAT 50
***** * * * *****
```

Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de exones 12 y 13 del gen de β -catenina. Se muestra un ejemplo del alineamiento de las secuencias de las hebras sentido amplificadas a partir de DNA genómico de distintas biopsias. Se observa una inserción de una citosina en la secuencia de la biopsia número G 425 A y la transición de una timina por una citosina. La N que se destaca en la secuencia de la hebra sentido de la biopsia G252B corresponde a un error de la secuenciación que no pudo identificar la base correspondiente.

Posteriormente, con el fin de corroborar si las mutaciones encontradas eran reales o no, se procedió a hacer tres comparaciones:

- entre la secuencia del gen de la base de datos del NCBI y la secuencia de la hebra sentido de la biopsia (Figura 12 A);
- entre la secuencia de la hebra sentido y la secuencia de la hebra antisentido de la misma biopsia (Figura 12 B); y
- finalmente, entre la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia y la secuencia del gen en la base de datos NCBI (Figura 12 C).

Con este tipo de comparación, pudo comprobarse que las mutaciones encontradas en la hebra sentido no eran reales, puesto que el alineamiento con su correspondiente hebra antisentido no mostraba concordancia.

A

```
Templado          GTTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCCATGAAAACA 149
090616-10_F11_G425A-catafrw.ab -TTTGTGTTGTGTTTTCTCCTTAGCTCGCTTCATTCTCCCATGAAAACA 49
*****
```

B

```
090616-10_F11_G425A-catafrw.ab TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCTCGCTTCATTCTCCCATGAAAACAT 50
Inversa TTTTGGTTTGTGTTTTCTCCTTAGCT-GCTTTATTCTCCCATGAAAACAT 49
*****
```

C

```
Templado          TTAGCTGCTTTATTCTCCCATGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGA 180
Inversa TTAGCTGCTTTATTCTCCCATGAAAACATCCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGA 79
```

Figura 12. Validación de la secuencia por comparación con la secuencia de la base de datos del NCBI. En A se observa una inserción de una citosina y una transición de una timina a una citosina en la secuencia de la hebra sentido de la biopsia G425A. En B se observa que en la secuencia de la hebra antisentido (inversa), no hay ni inserción de citosina ni cambio de timina por citosina. En C se muestra la identidad completa entre la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia G425A y la secuencia del gen obtenida de la base de datos.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo de todas las hebras antisentido de las biopsias entre sí y también con la secuencia de la base de datos del NCBI (Figura 13). Se obtuvo casi un 100% de concordancia entre las secuencias, excepto por dos errores que pudieron ser explicados por sus correspondientes electroforetogramas (ver Figura 10).

Por lo tanto, con este tipo de análisis no se encontraron mutaciones en las secuencias de DNA genómico de las biopsias estudiadas.

```

Inversa_G252A-catarev      CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
_Inversa_de_G425B-catarev  CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
_Inversa_G252B-catarev    CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
_Inversa_de_G425A-catarev  CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
_Inversa_G259A-catarev    CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
Templado_Genómico         CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
_Inversa_G335A-catarev    CCAAAGAGTAGCTGCAGGGGTCCTCTGTGAACCTTGCTCAGGACAAGGAAG
*****

Inversa_G252A-catarev      CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
_Inversa_de_G425B-catarev  CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
_Inversa_G252B-catarev    CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
_Inversa_de_G425A-catarev  CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
_Inversa_G259A-catarev    CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
Templado_Genómico         CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
_Inversa_G335A-catarev    CTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCACAGCTCCTCTGCACAGAGTTA
*****

Inversa_G252A-catarev      CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
_Inversa_de_G425B-catarev  CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
_Inversa_G252B-catarev    CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
_Inversa_de_G425A-catarev  CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
_Inversa_G259A-catarev    CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
Templado_Genómico         CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
_Inversa_G335A-catarev    CTTCACTCTAGGAATGAAGGTGTGGGTAAGTAAAAAGGAACCAAAGCCTT
*****

Inversa_G252A-catarev      TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
_Inversa_de_G425B-catarev  TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
_Inversa_G252B-catarev    TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
_Inversa_de_G425A-catarev  TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
_Inversa_G259A-catarev    TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
Templado_Genómico         TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
_Inversa_G335A-catarev    TAGCAGATGTTGACATTGAAGTCTCAGTTTTTCTCAAGGGCCTTTTTTCT
*****

Inversa_G252A-catarev      CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
_Inversa_de_G425B-catarev  CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
_Inversa_G252B-catarev    CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
_Inversa_de_G425A-catarev  CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
_Inversa_G259A-catarev    CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
Templado_Genómico         CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
_Inversa_G335A-catarev    CCTTGTCTCTTAGCGACATATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGA
*****

Inversa_G252A-catarev      GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
_Inversa_de_G425B-catarev  GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
_Inversa_G252B-catarev    GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
_Inversa_de_G425A-catarev  GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
_Inversa_G259A-catarev    GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
Templado_Genómico         GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
_Inversa_G335A-catarev    GGACAAGCCACAAGATTACAAGAAACGGCTTTCAGTTGAGCTGACCAGCT
*****

Inversa_G252A-catarev      CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
_Inversa_de_G425B-catarev  CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
_Inversa_G252B-catarev    CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
_Inversa_de_G425A-catarev  CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
_Inversa_G259A-catarev    CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
Templado_Genómico         CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
_Inversa_G335A-catarev    CTCTCTTCAGAACAGAGCCAAATGGCTTGGAATGAGGTAGGAAATGTGA-
*****

Inversa_G252A-catarev      GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
_Inversa_de_G425B-catarev  GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
_Inversa_G252B-catarev    GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
_Inversa_de_G425A-catarev  GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
_Inversa_G259A-catarev    GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
Templado_Genómico         GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
_Inversa_G335A-catarev    GCAGTTATTTATCTGGTAGTTTCTAGAGCAGGTATGGCAGCTTGTCTT
*****

```

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de exones 12 y 13 del gen de β -catenina. Se muestra el alineamiento de las secuencias de las hebras antisentido (inversas), con la secuencia del gen de la base de datos NCBI (templado genómico). La N que se destaca en la secuencia de la hebra sentido de la biopsia G252B corresponde a un error de la secuenciación que no pudo identificar la base correspondiente. La inserción de una adenina en la secuencia de la hebra G335A corresponde a un error de la secuenciación comprobado en el electroforetograma.

Amplificación del exón 12 del gen de β -catenina por PCR a partir de cDNA de las biopsias de colon.

En la amplificación del cDNA del exón 12 del gen de β -catenina se utilizó RNA total de las biopsias de colon, extraído, cuantificado y evaluado en su integridad según se describe en la sección de Materiales y Métodos. En la figura 14 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observa una banda de 360pb correspondiente al amplificado esperado.

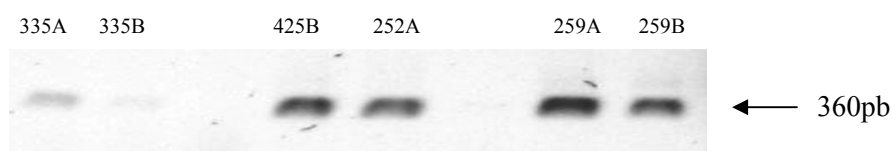


Figura 14. Amplificación por PCR del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA. Productos de amplificación por PCR obtenidos a partir de 6 muestras diferentes y analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Sobre cada carril se indica el número de identificación de la biopsia. La flecha indica el tamaño molecular del producto de PCR.

Análisis de electroforetogramas de secuenciación del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA.

Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a la empresa biotecnológica Macrogen (Seoul, Korea) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados, graficados como electroforetogramas, fueron analizados utilizando el programa Chromas Lite 2.01.

Se procedió a buscar mutaciones utilizando el mismo procedimiento anterior para DNA genómico. Los electroforetogramas del exón 12 amplificado desde las biopsias fueron analizados y se comprobó que no existían mutaciones donde se encuentran las serinas 605 (Figura 15) y 646. Tal como se describió anteriormente, cuando se detectaron discrepancias entre las secuencias de las hebras sentido de los productos de PCR de cada biopsia y la

secuencia del gen obtenida de la base de datos del NCBI se procedió a comparar las secuencias de las hebras antisentido y sentido de la biopsia entre sí, así como la secuencia del gen obtenido de la base de datos del NCBI y la secuencia de la hebra antisentido (Figura 16).

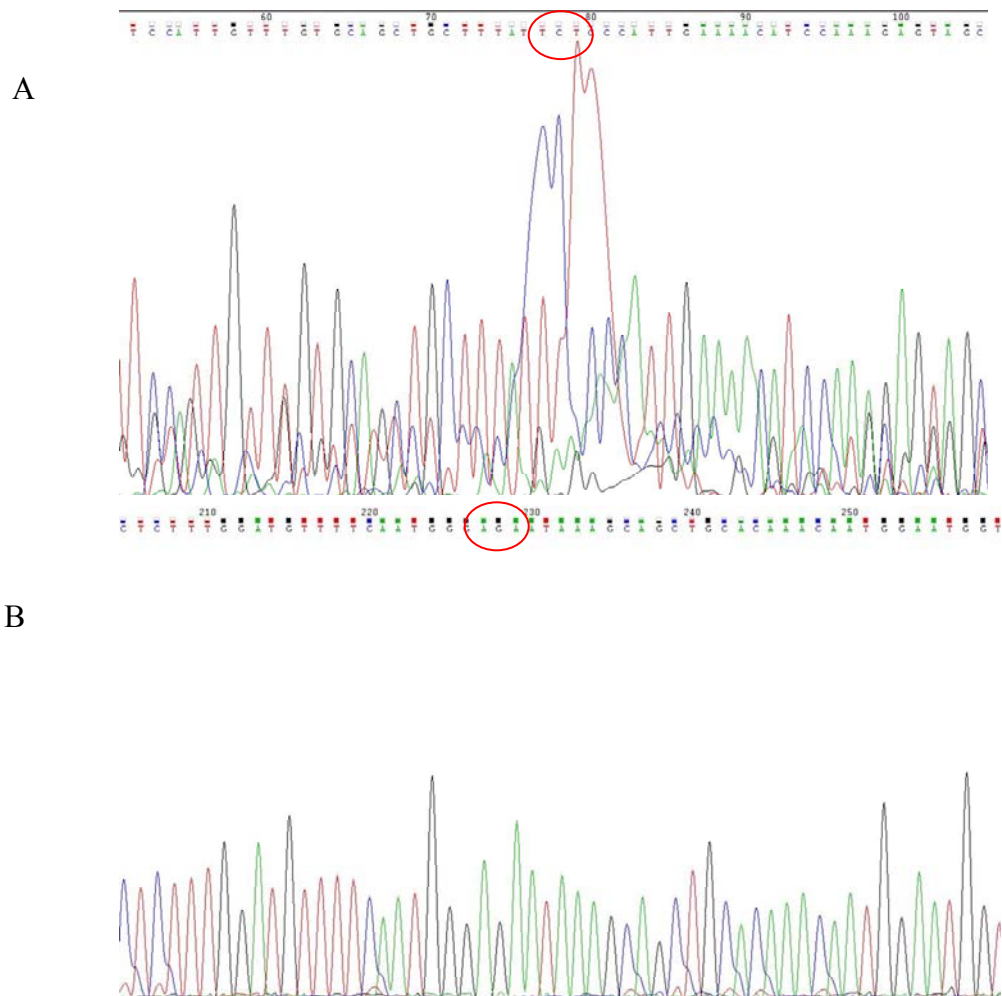


Figura 15. Electroforetogramas de la secuenciación del exón 12 de β -catenina. En la parte A de la figura se observa el electroforetograma de la hebra sentido y en B el electroforetograma de la hebra antisentido. En un círculo rojo se presenta la serina 605 en la hebra sentido (A) y en la hebra antisentido (B) del producto de PCR de la biopsia C252A. Existe identidad entre ambas hebras.

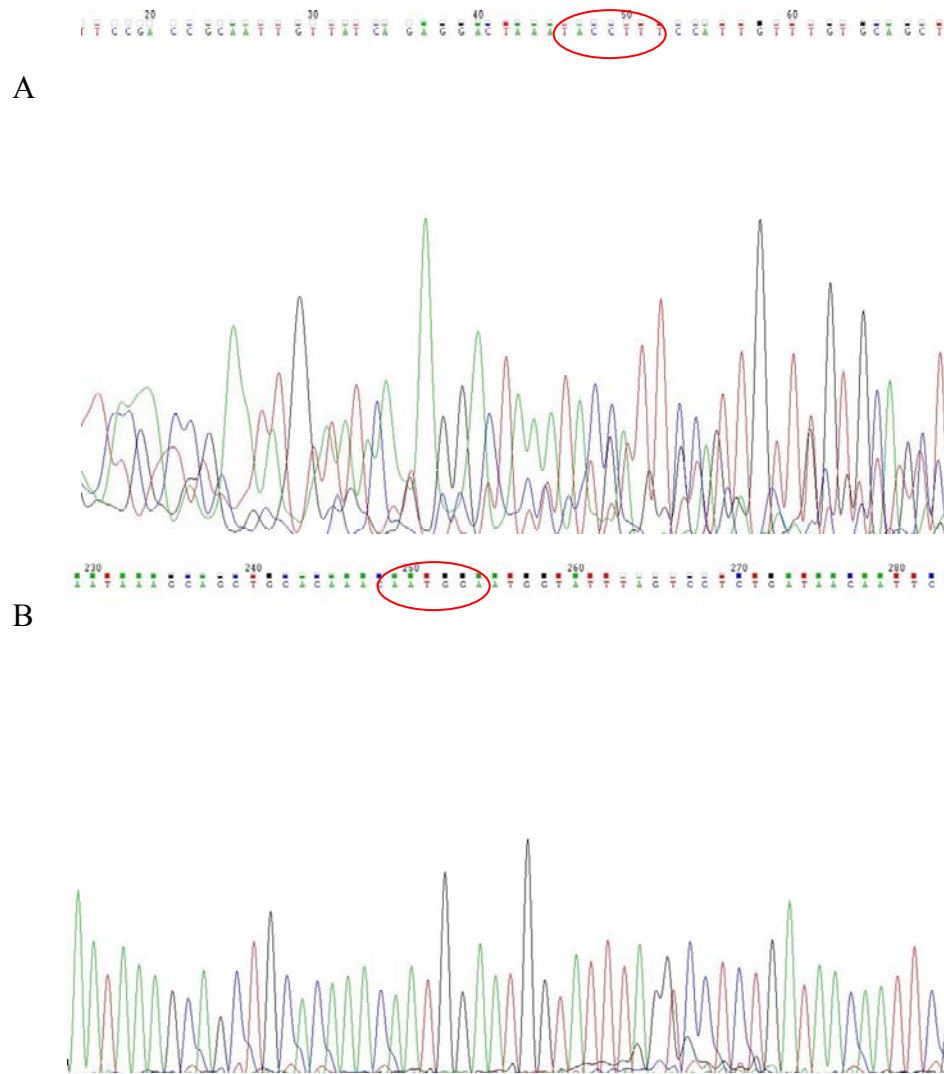


Figura 16. Validación de la secuencia por comparación entre hebras sentido y antisentido. En A se muestra la biopsia C252A en su hebra sentido donde se observa la transversión de una adenina por una timina en la posición 50. En B se muestra la hebra antisentido de la misma biopsia donde no se presenta este cambio de base

Análisis por alineamiento de las secuencias del exón 12 del gen de β -catenina a partir de cDNA.

Las secuencias obtenidas para cada biopsia se compararon entre ellas y con la secuencia del cDNA en la base de datos NCBI mediante la utilización de un programa ClustalW obtenido de internet, como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 17 se muestra un ejemplo de validación de la secuencia de cada hebra del producto de PCR, con el mismo procedimiento utilizado para el DNA genómico.

A

```

Templado      TTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTG 112
|||||
C252 A fw     TTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTG 60
  
```

B

```

C252A-frw.   AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCAT 58
Inversa      AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCCAT 100
  
```

C

```

templado     AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATC 120
Inversa      AGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTTATTCTCCATTGAAAACATC 110
*****
  
```

Figura 17. Validación de la secuencia por comparación con la secuencia de la base de datos del NCBI. En A se observa la transversión de una adenina por una timina en la secuencia de la hebra sentido de la biopsia C252A. En B se observa que no existe esta transversión en la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia. En C se comprueba la identidad entre la secuencia de la hebra antisentido de la biopsia y la secuencia del gen obtenida de la base de datos del NCBI.

Como se expuso anteriormente, se optó por considerar las hebras antisentido para la comparación, debido a la superior calidad de su secuenciación. En la figura 18 se expone el alineamiento de todas las secuencias de las hebras antisentido de las biopsias con la secuencia de la base de datos del NCBI.

Es así como, con este tipo de análisis no se encontraron mutaciones en las secuencias del cDNA de las biopsias estudiadas.

```

_Inversa_C425B-cdnabrev      AATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTT
_Inversa_C335A-cdnabrev     AATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTT
_Inversa_C259B-cdnabrev     AATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTT
_Inversa_C259A-cdnabrev     AATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTT
_Inversa_de_C252A-cdnabrev  AATTGTTATCAGAGGACTAAATACCATTCCATTGTTTGTGCAGCTGCTTT
_Templado_cDNA              *****

_Inversa_C425B-cdnabrev     ATTCTCCCATTGAAAACATCCAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAA
_Inversa_C335A-cdnabrev     ATTCTCCCATTGAAAACATCCAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAA
_Inversa_C259B-cdnabrev     ATTCTCCCATTGAAAACATCCAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAA
_Inversa_C259A-cdnabrev     ATTCTCCCATTGAAAACATCCAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAA
_Inversa_de_C252A-cdnabrev  ATTCTCCCATTGAAAACATCCAAGAGTAGCTGCAGGGTCTCTGTGAA
_Templado_cDNA              *****

_Inversa_C425B-cdnabrev     CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCAC
_Inversa_C335A-cdnabrev     CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCAC
_Inversa_C259B-cdnabrev     CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCAC
_Inversa_C259A-cdnabrev     CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCAC
_Inversa_de_C252A-cdnabrev  CTTGCTCAGGACAAGGAAGCTGCAGAAGCTATTGAAGCTGAGGGAGCCAC
_Templado_cDNA              *****

_Inversa_C425B-cdnabrev     AGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACAT
_Inversa_C335A-cdnabrev     AGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACAT
_Inversa_C259B-cdnabrev     AGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACAT
_Inversa_C259A-cdnabrev     AGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACAT
_Inversa_de_C252A-cdnabrev  AGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACCTAGGAATGAAGGTGTGGCGACAT
_Templado_cDNA              *****

_Inversa_C425B-cdnabrev     ATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
_Inversa_C335A-cdnabrev     ATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
_Inversa_C259B-cdnabrev     ATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
_Inversa_C259A-cdnabrev     ATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
_Inversa_de_C252A-cdnabrev  ATGCAGCTGCTGTTTTGTTCCGAATGTCTGAGGACAAGCCACAAGATTAC
_Templado_cDNA              *****

```

Figura 18. Alineamiento múltiple de las secuencias del exón 12 del gen de β -catenina. Se muestra el alineamiento de las secuencias de las hebras antisentido (inversas) del cDNA amplificado de las biopsias, con la secuencia del exón 12 de la base de datos NCBI. La N que se destaca en la secuencia de la hebra sentido de la biopsia G252B corresponde a un error de la secuenciación como se explicó anteriormente en el análisis de los electroforetogramas del DNA genómico.

7. DISCUSIÓN.

En general, la búsqueda de mutaciones en genes involucrados en la vía Wnt-canónica se desarrolla con la posibilidad de encontrar una herramienta de diagnóstico del cáncer de colon, u otros donde la ruta participe, además de su utilización como blanco de nuevas drogas o complemento a los tratamientos ya existentes.

Los tratamientos convencionales del cáncer de colon raramente consideran las propiedades biológicas asociadas con las mutaciones principalmente porque hay poca información sobre la influencia de estos cambios del DNA en la historia natural de la respuesta a tratamientos particulares (Souglakos et al, 2009). Sin embargo, los tumores colorrectales son típicamente accesibles para su caracterización molecular y también la localización de mutaciones en exones específicos (Souglakos et al, 2009).

Existen estudios que permiten suponer que una mutación puede servir como marcador pronóstico. Al respecto, ciertas lesiones moleculares en un tumor primario de cáncer colorrectal pueden ser marcadores de mejoría clínica (Souglakos et al, 2009). Por ejemplo, se sabe que mutaciones en los exones 9 y 20 del oncogen *PIK3CA* están asociadas con una reducida supervivencia libre de recaídas en pacientes con estadio II ó III (Kato et al, 2007).

En el caso particular de β -catenina, la mayoría de las mutaciones descritas en la literatura se localizan en la región N-terminal, donde se encuentran los residuos de serina/treonina que son blanco de fosforilación por GSK3 β (Polakis, 2000). Sin embargo, en la región C-terminal no se han descrito mutaciones, por lo que la búsqueda de alguna nos sugirió inicialmente un aporte interesante al conocimiento de la progresión maligna del cáncer de colon. Además, muy recientemente se ha descrito un hallazgo que motivó aún más nuestro estudio, donde se mostró que *in vivo* las serinas 191 y 605 son sitios de fosforilación por la kinasa JNK2 en respuesta a una señal Wnt (Wu et al, 2008).

Cambios en el desarrollo de la investigación

De acuerdo a los datos recién mencionados, en un principio se propuso analizar los exones 12 y 13 de β -catenina amplificados por PCR de DNA genómico extraído desde biopsias de colon fijadas en formalina tamponada e incluidas en parafina. Durante los primeros meses de la investigación se buscó estandarizar la extracción del DNA y el protocolo de PCR para realizar los objetivos perseguidos. Sin embargo, a pesar del mucho tiempo invertido, este tipo de muestras no poseía las características necesarias para realizar lo que se había propuesto.

Es así como luego de múltiples esfuerzos se llegó a la conclusión de que el tratamiento a que estas muestras habían sido expuestas llevaba a degradación del DNA genómico, en consecuencia no sería posible amplificar a partir de ellas el producto de PCR buscado.

En las circunstancias anteriores, surgió la posibilidad de cambiar el tipo de muestras a estudiar, ya que afortunadamente en el Banco de tejidos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se disponía de muestras de tejido congelado. Entonces se procedió a trabajar a partir de muestras de tejido congelado, lo que permitía además extraer RNA de las mismas biopsias, transformando este contratiempo en una oportunidad.

Estrategias moleculares abordadas.

Se estudió el DNA genómico para buscar mutaciones en los exones 12 y 13, con la posibilidad de analizar también las secuencias intrónicas, aumentando de esta manera la posibilidad de un hallazgo no previsto.

Por otro lado, la utilidad de la purificación del RNA de las biopsias es que se pudo preparar el cDNA, lo que suponía una ventaja, puesto que se sabe que β -catenina es una

proteína mayormente expresada en células tumorales, esto es, su mRNA está también mayormente expresado. Por consiguiente, el hecho de producir un cDNA con partidores específicos para una región determinada de β -catenina nos permitió enfocarnos en un solo gen de la totalidad de mRNAs presentes en una biopsia, lo cual permitiría además aumentar las posibilidades de detectar las mutaciones buscadas. Hay que destacar que la búsqueda de mutaciones en DNA geonómico y cDNA se realizó en paralelo. En el caso que se hubiera detectado alguna mutación heterocigota, hubiera sido posible discriminar mediante la secuenciación del cDNA si alguno de los alelos se expresaba mayoritariamente.

Análisis crítico de los resultados obtenidos.

Fue posible obtener DNA genómico y RNA íntegro de 18 biopsias de colon congeladas dispuestas para este estudio. Sin embargo el rendimiento fue irregular lo que arrojó bajas concentraciones en algunas muestras de DNA genómico. Una posible causa puede atribuirse a la utilización de un protocolo no probado anteriormente para este tipo de tejidos. Con estas muestras también se logró el objetivo de amplificarlas por PCR convencional.

Por otro lado, hubiese sido ideal contar para todas las biopsias con su contraparte tumoral pero en algunos casos no fue posible por no encontrarse en el banco de tumores. De todos modos se pudo obtener algunas lo que, en la circunstancia de encontrar mutaciones, habría permitido sugerir una correlación entre la progresión a malignidad y la posesión de estos cambios en el DNA.

Los resultados que arrojó la secuenciación fueron dispares en su calidad. En el caso del DNA genómico, se pudo contar con secuencias de pureza aceptable para la totalidad de las hebras antisentido. No ocurrió lo mismo con las secuencias de la hebra sentido, donde se observó una gran cantidad de problemas con sobreposición de picos correspondientes a dos o

tres nucleótidos, lo cual se confirmó en los electroforetogramas generados. Es por esto que debió hacerse la comparación entre la hebra antisentido con la secuencia de referencia, lo que permitió establecer la concordancia entre las secuencias de las biopsias y la secuencia de la base de datos. Por lo tanto, utilizando esta estrategia se pudo concluir que no existían mutaciones en la región específica del gen de β -catenina analizada para esas biopsias de cáncer de colon.

Para el cDNA la situación fue distinta, las secuencias de las hebras sentido eran de más baja calidad aun que en la secuencia de DNA genómico. En los electroforetogramas se pudo observar errores como superposiciones de picos, picos con proyecciones en sentido 3' que enmascaraban o alteraban algunas secuencias, en algunos casos haciendo aparecer falsas inserciones. Las causas de estos problemas podrían explicarse por impurezas presentes en el protocolo de secuenciación, ya que todas las secuencias mostraron la elución de un compuesto fluorescente alrededor de los 70 nucleótidos, lo que fue comprobado para el DNA genómico y para el cDNA, en hebras sentido y antisentido.

Otra explicación para las diferencias en calidad de secuenciación entre ambas hebras puede ser la distinta capacidad de unión de los partidores en cada caso, ya que el error se observó solamente en las hebras sentido. Por último, la mayor calidad en general de las secuencias del DNA genómico podría deberse a la calidad de los amplificadores, ya que en los geles de agarosa se pudo constatar que las bandas del producto de PCR eran más intensas, habiendo utilizado el mismo programa de PCR.

Lo señalado anteriormente refuerza la idea de que fue de suma utilidad contar con las secuencias de las hebras antisentido, porque de otro modo no se habría podido desmentir que aquellos cambios en la secuencia que generaban discrepancias en los alineamientos con la

secuencia del gen obtenida en la base de datos fueran verdaderamente mutaciones, sino que errores en la técnica de secuenciación, como fue lo que se concluyó en este estudio.

Proyecciones.

En esta tesis se buscó mutaciones en los codones que codifican para los residuos Ser-605 y Ser-646 de β -catenina, por ser éstos sitios putativos de fosforilación por la proteína quinasa CK2, la cual regula positivamente la vía Wnt-canónica (Song et al, 2000; Song et al, 2003; Tapia et al, 2006). Nuestros resultados no permitieron detectar ninguna mutación ni en esas serinas ni en otros codones presentes en los exones 12 y 13, lo cual se estudió tanto en el DNA genómico como en el cDNA de las biopsias de muestras tumorales y normales.

Lo anterior, si bien indica que la región C-terminal de β -catenina no sería blanco de mutaciones que determinan la progresión a malignidad de un tumor, no descarta la posibilidad de que el dominio C-terminal de β -catenina posea una función regulatoria sobre su actividad transcripcional. Asimismo, el hecho de que no haya mutaciones en los residuos estudiados no significa que pueda existir algún cambio en el extremo C-terminal de β -catenina producto de la interacción con otras proteínas, como sugieren los recientes resultados obtenidos en nuestro laboratorio. En éstos se ha observado, mediante ensayos de actividad reportera, que la β -catenina mutada en el residuo Ser-646 a ácido aspártico tiene una mayor actividad transcripcional comparada con la proteína silvestre. Estos hallazgos también han sido corroborados con ensayos de microscopía confocal de inmunofluorescencia en cuanto a localización subcelular (datos no mostrados).

Finalmente, es importante destacar la utilidad de este tipo de estudios no sólo por los argumentos expuestos anteriormente relacionados con el cáncer de colon, sino que también

por la importancia de comprobar mediante secuenciación de las dos hebras del DNA las posibles mutaciones encontradas en investigaciones como ésta, ya que pueden conducir a una mal interpretación de resultados y la consecuente pérdida de tiempo y recursos.

8. REFERENCIAS

Bannura G. (2006) ¿Se puede mejorar la oportunidad del diagnóstico del cáncer colorrectal en Chile?. *Rev Chilena de cirugía* . 58:59-61.

Bhanot P., Brink M., Samos C., Hsieh J., Wang Y., Macke J., Andrews N. and Nusse R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 382 :225-230.

Bustos V., Ferrarese A., Venerando A., Marin O., Allende J. and Pinna L. (2006) The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of β -catenin phosphorylation by protein kinase CK1. *Proc Natl Sci USA*. 103 (52) : 19725-30.

Doble B., Woodgett J. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 116: 1175.

Fang D., Hawke D., Zheng Y., Xia Y., Meisenhelder J., Nika H., Mills G., Kobayashi R., Hunter T. and Lu Z. (2007) Phosphorylation of β -catenin by AKT promotes β -catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*. 282 (15): 11221-9.

Hoover B. (2008) β -catenin Mediated Wnt Signaling as a Marker for Characterization of Human Bone Marrow-Derived Connective Tissue Progenitor Cells. *The journal of Young Investigators*. Vol 12, issue 4.

Horst D. , Kriegl L., Engel J. , Jung A. , Kirchner T. (2009) CD133 and nuclear β -catenin : The marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *European journal of Cancer*. Article in press.

Ilyas M., Tomlison I. P., Rowan A., Pignatelli M. and Bodmer W. F. (1997) β -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Prix: Nati Acad Sci USA*. 94: 10330-10334.

Kato S, Iida S, Higushi T, Ishikawa T, Takagi Y, Yasuno M, Enomoto M, Uetake H , Sugihara K (2007) PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 121: 1771–1778

Levin B., Lieberman D., McFarland B., Smith R., Brooks D., Andrews K., Dash C., Giardello F., Glick S., Levin T., Pickhardt P., Rex D., Thorson A. and Winawer S. (2008) Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps. *CA Cancer J Clin*. 58: 130-160.

Li L., Yuan H., Weaver C. D., Mao J., Farr G. H. III, Sussman D. J., Jonkers J., Kimelman D. and Wu D. (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging to GSK in Wnt. Mediated regulation of LEF-1. *EMBO J*. 18:4233–4240.

Litchfield D. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J*. 369, 1-15.

Luchtenborg M., Weijenberg M., Roemen G., de Bruïne A., Van den Brandt P., Lentjes M., Mirian Brink., van Engeland M., Goldbohm A. and de Goeij A. (2004) APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* .25 : 1219-1226.

Medina E., Kaempffer A. (2001) Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile*.129: 1195-202.

Molenaar M., van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O., and Clevers H. (1996) Tcf -3 Transcription Factor mediates β -catenin-induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell*. 86: 391–399.

Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., and Kinzler K.W. (1997) Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*. 275: 1787–1790.

Munemitsu S., Albert I., Souza B., Rubinfeld B., and Polakis P. (1995) Regulation of intracellular of β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 3046–3050.

Munemitsu S., Albert I., Rubinfeld B., Polakis P. (1996) Deletion of an amino- terminal sequence β -catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol. Cell Biol*. 16: 4088-4094.

Nusse R. and Willert K. (1998) Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8:95-102.

Polakis P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 14:1837– 1851.

Rubinfeld B., Robbins P., El-Gamil M., Albert I., Porfiri E. and Polakis P. (1997) Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*. 275: 1790–1792.

Song D., Sussman D. and Seldin D. (2000) Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 275; 23790-23797.

Song D., Dominguez I., Mizuno J., Kaut M., Mohrs S. and Seldin D. (2003) CK2 Phosphorylation of the Armadillo Repeat Region of β -catenin Potentiates Wnt Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 24018-24025.

Souglakos J., Philips J., Wang R., et al (2009) Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 1-8

Tapia J., Torres V., Rodriguez D., Leyton L. and Quest A. (2006) Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced β -catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* . 103:15079-84.

Tatusova T. and Madden T. (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* .174:247-50.

Wagner U., Brownlees J., Irving N. G., Lucas F. R., Salinas P. C. and Miller C. C. (1997) Overexpression of the Mouse dishevelled-1 protein inhibits GSK-3 β - mediated phosphorylation of Tau in transfected mammalian cells. *FEBS Lett*. 411: 369–372.

Wu X. , Tu X. , Joeng K.S. , Hilton M. J. , Williams D.A., Long F. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt-signaling. *Cell*.133: 340-53.

Yanagawa S., van Leeuwen F., Wodarz A., Klingensmith J. and Nusse R. (1995) The disheveled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev*. 9 : 1087–1097.

Yang-Snyder J., Miller J. R., Brown J. D., Lai C. J. and Moon R. T. (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway . *Curr. Biol*. 6 : 1302–1306.

Zeng X., Tamai K., Doble B., Li S., Huang H., Habas R., Okamura H., Woodgett J. and He X. (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 438: 873-877.