



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD, BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con análisis de Alta Resolución de Fusión (PCR-HRM)

en la búsqueda de mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-ras en células con cáncer cervicouterino

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Maria del Consuelo Leija Morales

Asesor interno: Dra. Diana Elinos Calderón.

Asesor externo: Dr. Mauricio Salcedo Vargas.

Contenido

1. Resumen	3
2. Justificación	3
3. Marco teórico	4
3.1 Cáncer	4
3.1.1 Cérvix	6
3.1.2 Lesiones pre malignas del cérvix uterino	8
3.1.3 Factores de riesgo	9
3.2 Cáncer cervicouterino	10
3.3 Proteínas RAS	12
3.3.1 RAS en cáncer	13
3.4 Líneas celulares de CaCu	15
3.5 Técnicas de biología molecular para diagnóstico	16
3.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
3.5.2 PCR-HMR	17
3.5.3 Otras técnicas para la búsqueda e identificación de mutaciones	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1 General	19
5.2 Particulares	19
6. Metodología	20
6.1 Diagrama de flujo de trabajo	20
6.2 Extracción y cuantificación de DNA de líneas celulares y colon	21
6.3 PCR	22
6.3.1 Reamplificado de productos PCR	24
6.4 Purificación	24
6.5 PCR-HRM	25
7. Resultado	27
7.1 Extracción y cuantificación de DNA de líneas celulares provenientes de CaCu y colon	27
7.2 PCR tiempo real de las líneas provenientes de CaCu y colon	29



7.3 PCR punto final del gen k-ras en líneas celulares provenientes de CaCu y colon.....	29
7.4 Cuantificación de la purificación del reamplificado de DNA del producto de PCR punto final de líneas celulares provenientes de CaCu y colon.....	31
7.5 PCR-HRM del gen K-ras en líneas celulares provenientes de CaCu y colon.....	31
7.6 Secuenciación Sanger.....	33
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	40
10. Bibliografía.....	41
11. Figuras.....	47



1. Resumen

Diversos estudios han revelado que cuando existe una mutación en los genes relacionados con la proliferación celular, hay un descontrol en el crecimiento celular dando lugar a la carcinogénesis. El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad que se ha estudiado a profundidad, sin embargo, sigue habiendo interrogantes, sobre todo en el aspecto molecular. Bajo este contexto, el presente estudio realizó la búsqueda mutaciones en el codón 12-13 del gen *K-ras*, el cual se sabe codifica para la proteína K-RAS, que tiene una actividad GTPasa, cuya función es la de participar en la transmisión de señales para el control de crecimiento, diferenciación y metabolismo celular, para el mismo se utilizaron seis líneas celulares provenientes de CaCu, se realizó una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con análisis de alta resolución de fusión (HRM), lo que permitió observar si dichas líneas celulares tienen la mutación. Se usaron como controles una secuencia normal (wild type) del gen y otra con *K-ras* mutado. Para las PCR se contaron con oligonucleótidos específicos, que amplificaron la región del gen que contiene los codones 12 y 13 del exón dos del cromosoma 12, lugar donde se sabe hay una mayor probabilidad de encontrar mutaciones del gen. La finalidad del presente no sólo fue realizar la detección de la mutación en las líneas utilizadas, sino también estandarizar la técnica de PCR-HRM con la intención de que pueda formar parte de los estudios realizados a los pacientes oncológicos, para la toma de decisiones en el manejo y tratamiento, ya que se sabe que los mutantes de *K-ras* son capaces de activar la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo que puede influir en la acción de los fármacos dirigidos a esta vía.

2. Justificación



El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, según estudios de la Organización Mundial de la Salud se estima que en el año 2015 ocasionó aproximadamente 8.8 millones de defunciones; en México, la información estadística de la Secretaría de Salud reporta al cáncer cervicouterino (CaCu) como la segunda causa de muerte por cáncer entre la población femenina, con una tasa de mortalidad de 11.3 defunciones por cada 100,000 mujeres, así como también se estima que anualmente se registran 13,960 nuevos casos, es por ello que es considerado como un importante problema de salud. Las investigaciones actuales sobre CaCu y del cáncer en general se enfocan en la comprensión del comportamiento molecular de la enfermedad, pudiendo así establecer las líneas de tratamiento, las cuales están basadas principalmente en agentes citotóxicos, que permitan mejorar la sobrevivencia; es así que a través de técnicas de biología molecular y con el desarrollo de la bioinformática, se han logrado identificar mutaciones en las proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, crecimiento y diferenciación, procesos ligados directamente con el cáncer, entre ellas están las proteínas RAS y los genes que codifican para dichas proteínas, como el gen *K-ras*. De manera interesante, la identificación de mutaciones en este gen ha permitido predecir la resistencia a tratamientos y pronóstico de la enfermedad, por lo cual es importante investigar este tipo de mutaciones en la población mexicana, con técnicas confiables y relativamente sencillas como es la reacción en cadena de la polimerasa con análisis de alta resolución de fusión (PCR-HRM).

3. Marco teórico

3.1 Cáncer

La palabra cáncer se utiliza para referirse a las enfermedades asociadas con alteración entre la proliferación celular descontrolada y los mecanismos normales de apoptosis (muerte celular programada) (Granado-García y Herrera Gómez, 2010). Para que tenga lugar la formación de tumores cancerígenos, las células deben adquirir ciertas capacidades



biológicas que les permitan desarrollarse y proliferar, por ejemplo deben mantener una señalización proliferativa, eludir los genes supresores de crecimiento, resistir la apoptosis, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), así como activar la invasión y metástasis (desarrollo de nuevos tumores en zonas distantes) (Hanahan & Weinberg, 2011). Para que existan estas capacidades anormales de las células cancerosas, se alteraron los mecanismos normales, que en la gran mayoría estas alteraciones son de tipo multifactorial, muchos de los cambios genéticos asociados con el cáncer humano incluyen la activación de diferentes genes celulares (proto-oncogenes *RAS*, *MYC*) y/o la inactivación de diversos genes del supresores (*P53*, *RB*, *ERB-B2A*, *APC*, *MCC*). Estas alteraciones pueden ser producidas por mutaciones en la expresión de genes, como en los proto-oncogenes, que son los encargados de promover el crecimiento y la división celular a través de una secuencia génica específica para la codificación de proteínas que participan en este proceso, si existe una alteración o mutación en la secuencia el proto-oncogén, éste se convierte en un oncogén, el cual favorecerá al desarrollo de la enfermedad, o bien en los genes supresores de tumores que se inhabilita la apoptosis dando por consecuencia un tumor tal vez cancerígeno (Pochylski, et. A.I 2003; García-García Bacones-Martínez, 2009).

El cáncer cervicouterino es una enfermedad caracterizada por cambios en las células epiteliales que recubren el cuello uterino, generando una anormalidad en la que las células se desorganizan, hay cambios en el desarrollo, crecimiento, forma y organización de las células. Este tipo de cáncer se estima que es el segundo más común entre la población femenina (Woodman & et. al. 2007). La Secretaría de Salud de México menciona que esta enfermedad es la principal causa de muerte por tumor maligno en las mujeres de los países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados, con un número aproximado de 266,000 defunciones anuales en el mundo, de los cuales el 87% corresponden a los países subdesarrollados. En el país se tiene registro 3,771 defunciones, con una tasa de 11.3

defunciones por 100,000 mujeres (SS, 2017). A continuación, se detalla un poco más esta enfermedad.

3.1.1 Cérvix

Se le conoce como cérvix a la región localizada en el aparato reproductor femenino, que forma parte del tracto genital inferior, localizado en la porción inferior del útero, el cual contiene dos regiones bien delimitadas, el exocérvix que histológicamente está formando por epitelio no queratinizado de células escamosas y el endocérvix que contiene una hilera de células cilíndricas mucíparas (productoras de moco) revistiendo la superficie, entre ambas regiones se encuentra la llamada zona de transformación, que es una zona escamo-columnar en la que se unen las dos regiones, esto es el epitelio escamoso unido con el cilíndrico (figura 1), la importancia clínica de esta zona radica en que es el área dónde más frecuentemente se localizan las lesiones precursoras del CaCu (JCCT, 2017).

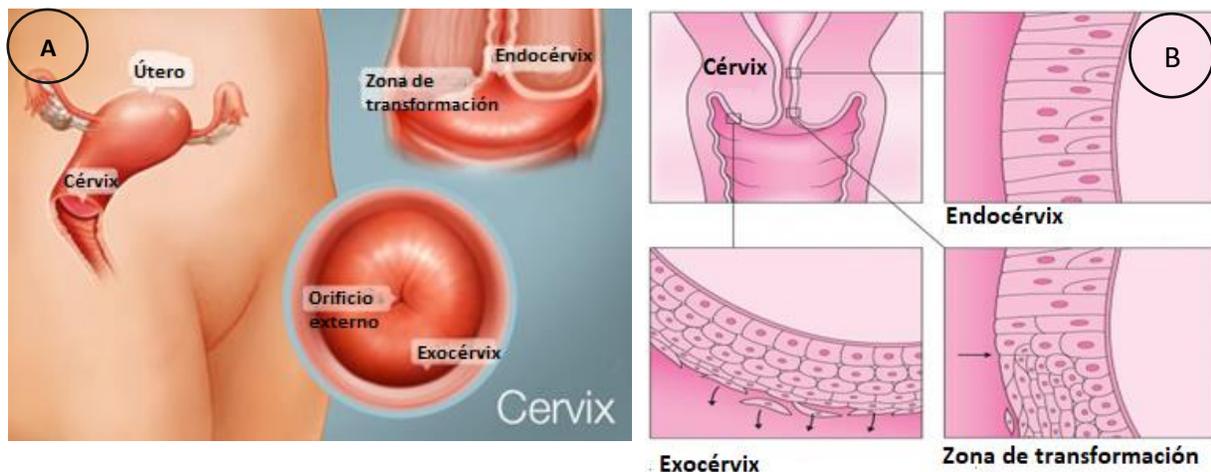


Figura 1. Localización anatómica del cérvix y composición histológica de la zona de transformación del cérvix. A) El cérvix se encuentra en la porción inferior del útero, formando parte del tracto genital inferior femenino, conformado por el exocérvix y el endocérvix, entre estas dos zonas se encuentra la zona de transformación. Modificada y tomada de: WebMD, 2017. B) el exocérvix está formado histológicamente por epitelio no queratinizado de células escamosas y el endocérvix por células cilíndricas mucíparas (productoras de moco) revistiendo la superficie. Modificada y tomada de: Jo's cervical cancer trust, 2017.





3.1.2 Lesiones pre malignas del cérvix uterino

Las lesiones pre malignas del cérvix se pueden sospechar mediante un examen citológico de las células exfoliadas del cérvix y es confirmada por estudio histológico del tejido cervical. Dentro de estas lesiones se pueden distinguir diferentes grados, dependiendo de la anormalidad histológica y grado de maduración celular, a los diferentes grados de anormalidad se les conoce como neoplasia intra epitelial cervical (NIC según la clasificación de Richart), las cuales son precursoras del cáncer invasor, van desde una displasia leve o NIC 1 donde la mitosis está confinada en la capa basal, en los dos tercios superiores del epitelio hay un grado discreto de anomalía citológica; displasia moderada NIC 2 se caracteriza por tener maduración celular en el tercio superior del epitelio y con los dos tercios inferiores con anormalidad citológica y mitosis, displasia grave/carcinoma in situ NIC 3, no muestra maduración, la mitosis y cambios citológicos atípicos se pueden ver en todo el epitelio. En estas lesiones puede haber una regresión, progresión y una persistencia de la infección según el grado de la lesión (Woodman et al., 2007; Granados- García y Herrera-Gómez, 2010).

Las lesiones también se pueden clasificar como de bajo y alto grado, las lesiones intraepiteliales de bajo grado se caracterizan por tener un patrón vascularizado normal, con una la lesión acetoblanca bien delimitada, sin mosaicos y sin puntilleo, lo que posiblemente corresponde a una lesión secundaria a infección por virus de papiloma humano (VPH), la cual puede tener una alta tasa regresión espontánea (Granados-García y Herrera-Gómez, 2010). Las lesiones intraepiteliales de alto grado presenta un patrón vascular incrementado y anormal con epitelio acetoblanco grueso, además de presentar mosaico, todo esto puede corresponder a un carcinoma in situ, estas lesiones tienen una tasa muy alta de persistencia y progresión. Las lesiones pueden ser visualizadas mediante colposcopia que es un examen intravaginal que sirve de tamizaje, en el que se magnifica la imagen con la ayuda de lentes,

se utiliza ácido acético que al reaccionar con el medio (glucógeno) pondrá de manifiesto zonas aceto-blancas donde exista lesión, como se muestra en la figura 2 (Woodman y et. al., 2007; Granados-García y Herrera-Gómez, 2010).

Estas lesiones precursoras pueden evolucionar a carcinoma in situ, en los grados más leves puede tardar años, pero en una displasia grave puede evolucionar en unos cuantos meses (Granados-García y Herrera-Gómez, 2010).

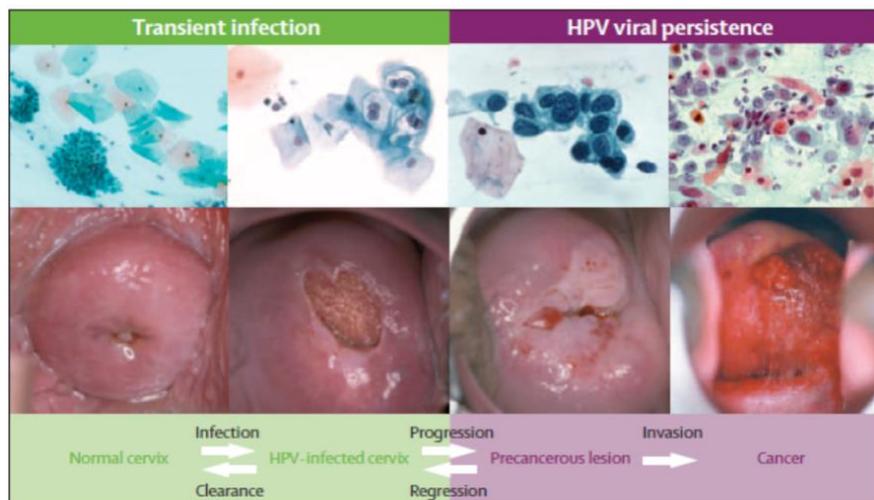


Figura 2. Pasos en el desarrollo del cáncer cérvico uterino. Fila superior citología, fila inferior vista por colposcopia. Se puede observar la evolución de la infección, en la que en etapas tempranas o de bajo grado puede haber una progresión, así como una regresión, pero en etapas tardías o de alto grado va progresando la lesión hasta convertirse en invasor o cáncer in situ. Modificada y tomada de Schiffman et al 2007.

3.1.3 Factores de riesgo

El desarrollo de la enfermedad CaCu es multifactorial, aunque muchos de estos factores están relacionados con conductas sexuales, en el 95% de los casos el principal factor o agente etiológico es el VPH, el tabaquismo es otro importante factor presente en casi todos los tipos de cáncer, sus componentes químicos aumentan el riesgo de CaCu ya que tienen efecto mutagénico en las células del cervix, el uso de anticonceptivos hormonales (progesterona y estrógeno) influyen en la expresión de los genes del VPH en la zona de transformación, ya que las células de dicha zona son muy sensibles al estrógeno (Dell &



Gaston, 2001). Se sabe de otros factores como, la nutrición, el alcoholismo, número elevado de parejas sexuales, inicio de la vida sexual a edad temprana, pacientes multíparas, así como la exposición a radiación de cualquier tipo son condicionantes para el desarrollo de la enfermedad (NIH, 2017).

3.2 Cáncer cervicouterino

En casi todos los casos el CaCu surge a través de una serie de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de un clon de células infectadas persistentemente a precáncer e invasión (Schiffman et al. 2007). La infección causada por el VPH, afecta la zona de transformación del cérvix. Gran cantidad de estudios han mostrado que el VPH contiene oncoproteínas, que bloquean la apoptosis celular como el gen E6, que está contenido en las mismas, así como el gen E7, que inhibe a la proteína de supresión tumoral de retinoblastoma (Mammas et al., 2004). Las alteraciones en los oncogenes y los genes supresores de tumores en las células del cuello uterino son esenciales para la carcinogénesis cervical (Iida et al., 2011). Del VPH se han identificado más de 100 subtipos, pero los tipos más frecuentes relacionados con CaCu son el tipo 16 y 18. Se sugiere que el VPH accede a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical, una vez infectado el epitelio los genes del virus se expresarán, así el DNA viral se replica a partir del DNA episomal (núcleos morados visualizados en la figura 4). En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial), el genoma viral se replica aún más, y los genes tardíos L1, L2 y E4 se expresan. Las proteínas L1 y L2 encapsidan los genomas virales para formar viriones de progenie en el núcleo. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado apoyan la replicación viral productiva. Se sabe que un número desconocido de infecciones por VPH de alto riesgo progresa a lesión intraepitelial cervical de alto grado (LIEAG). La progresión de lesiones no tratadas al cáncer invasivo y microinvasivo se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la pérdida o alteración asociada del gen E2 y la posterior regulación positiva de la expresión del oncogén E6 y E7, esto se puede apreciar en la figura 3 (Woodman et al 2007).

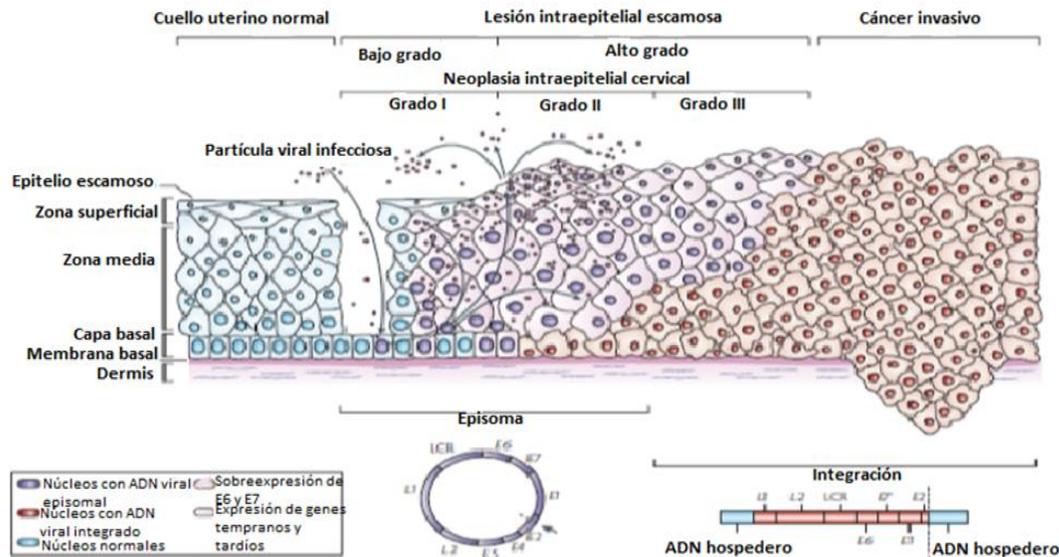


Figura 3. Progresión mediada por el VPH hacia el cáncer de cuello uterino. Se puede observar como las lesiones intraepiteliales de bajo grado apoyan la replicación viral productiva, y a las infecciones por VPH de alto riesgo progresar a neoplasia intraepitelial cervical de alto grado. Modificada y tomada de: Woodman y et. al., 2007.

La gran mayoría de los tipos de CaCu son carcinomas de células escamosas, seguidos por los adenocarcinomas (se originan en tejido glandular). Los últimos reportes mencionan que este tipo de cáncer ha ido en aumento, aunque no se sabe la razón de ello (Schiffman et al. 2007). También existen reportes de que los CaCu negativos para VPH son adenocarcinomas, los cuales están relacionados con peor pronóstico, ya que este tipo de pacientes no responden a las terapias convencionales o tratamientos de primera línea (Rodríguez-Carunchio et al. 2014).

Cuando existe una infección por VPH y en colaboración con los oncogenes RAS, la activación mutacional del gen *K-ras* puede estar involucrada en el desarrollo de un pequeño subconjunto de carcinomas cervicales en las primeras etapas de carcinogénesis en el cuello uterino (Dokianakis et al 1998), asociado a peor pronóstico, puesto que los reportes indican que hay una recurrencia a la enfermedad en un tiempo corto, así como también se sabe



que las mutaciones se presentan en etapas tumorales más avanzadas (Wegman y et .al 2010). Es sabido que el CaCu alberga altas tasas de mutaciones oncogénicas potencialmente detectables, el carcinoma epidermoide de cervix y el adenocarcinoma tienen perfiles moleculares distintos, lo que sugiere que los resultados clínicos pueden mejorarse con el uso de estrategias de tratamiento más adaptadas (Orlando y et. al. 2011; Wright y et. al 2013).

12

3.3 Proteínas RAS

Las proteínas RAS están involucrados en la diferenciación y crecimiento celular, pertenecen a la familia de las proteínas G, con capacidad de unir Guanosina Trifosfato (GTP) y el Guanosina Difosfato (GDP), además de actividad GTPasa (Segal et al., 1993), participa como mensajero en la cascada de reacciones que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. RAS se encuentran ancladas a la membrana celular, tienen una conformación estructural terciaria con regiones específicas que funcionan como interruptores, una de estas regiones está implicada en la unión GTP, otra donde RAS se ancla a la membrana por farnesilación en su extremo C-terminal y una más que es un domino efector donde reacciona con el GTP, llevándose a cabo la interacción con la proteína activadora de GTPasa (GAP), como muestra la figura 4. En condiciones normales GAP introduce una región conocida como dedo de arginina dentro del sitio con actividad enzimática de la proteína RAS, en ese lugar se capta GTP estabilizando la actividad, lo que permite que se hidrolice GTP liberando un fosforo orgánico e inactivando a estas proteínas; pero si existe una mutación, el sitio activo se verá afectado quedando encendido el interruptor y la función de proliferación celular dependiente de RAS se perpetua, ya que GTP permanecerá unido a la proteína, dando lugar a la formación de neoplasias o bien cuando existe un decrecimiento de la afinidad del GDP que también generará neoplasias (McCubrey et al., 2012; Parker & Mattos, 2017).

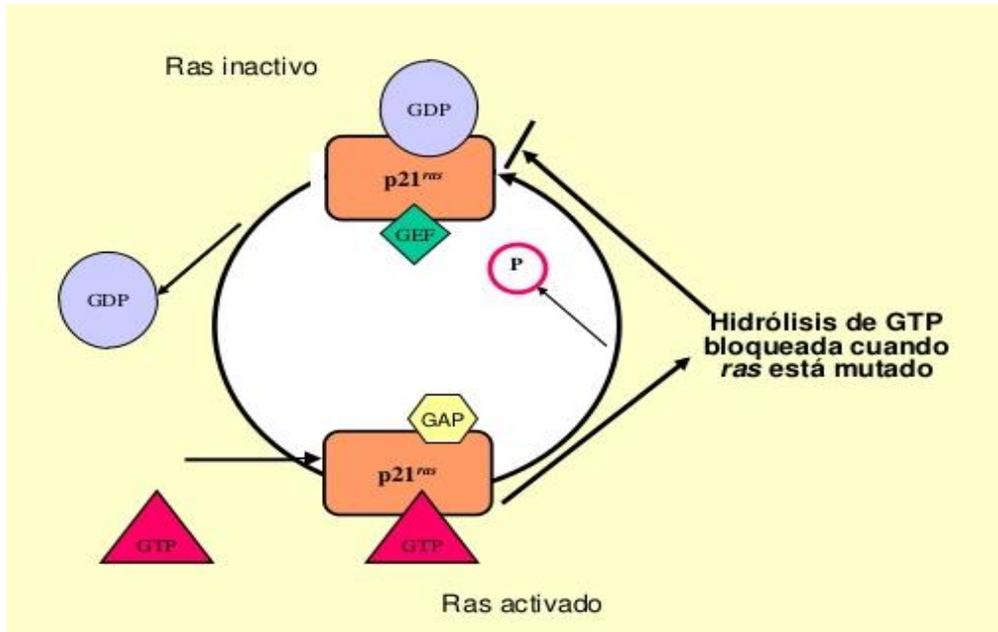


Figura 4. Gen RAS activo e inactivo. El GTP reacciona con RAS donde ha interaccionado con GAP que permite que se forme GDP al hidrolizar liberando un fósforo inorgánico que inactiva RAS, si hay una mutación se afecta el sitio activo de GAP lo que hace que RAS quede activo permanentemente. Modificada y tomada de: Ulloa, 2016.

3.3.1 RAS en cáncer

La cascada RAS/RAF/MEK/ERK es una importante vía de señalización que regula diversas funciones celulares, incluida la proliferación celular, supervivencia, diferenciación y la migración. Varios estudios han demostrado que las mutaciones en las quinasas de la vía de transducción RAS/RAF/MEK/ERK se observan frecuentemente en el cáncer humano, incluido el CaCu, algunas de estas rutas se pueden observar en la figura 5 (Zou et al 2017).

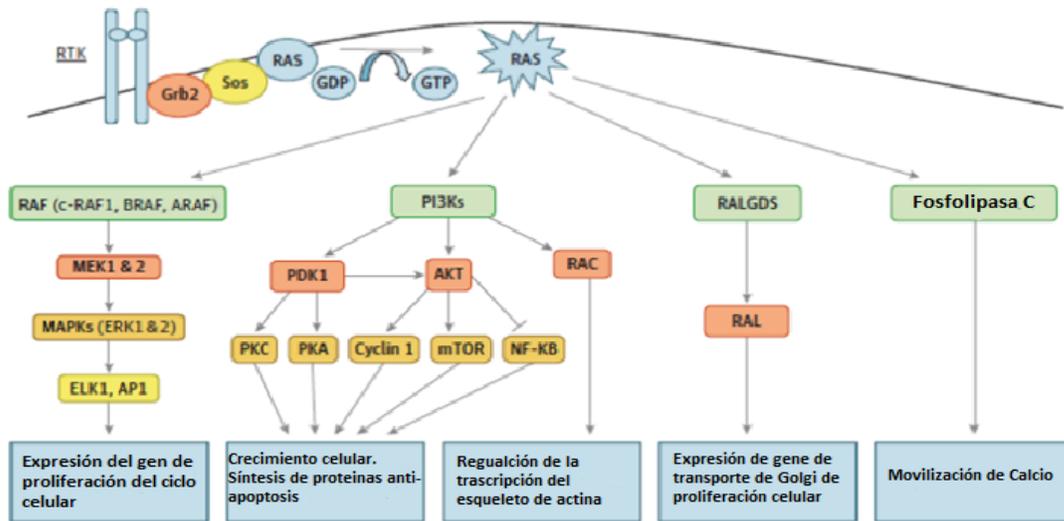


Figura 5. Parte de la cascada de la vía de señalización. Una vez activo, RAS interactúa con una multitud de familias de efectores. Estos incluyen proteína quinasas RAF, que posteriormente activan quinasa activada por mitógeno y/o ERK quinasa (MEK1 y 2) y cataliza la cascada de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y activación de múltiples factores de transcripción, incluyendo ELK1 y proteína activadora 1 (AP1) Se ha descubierto que las proteínas RAF son esenciales para los efectos proliferativos de las mutaciones de KRAS. Modificada y tomada de: Wood et al. 2016.

Los reportes de estudios moleculares indican que las mutaciones en RAS están presentes en el 30 % de los distintos tipos de cáncer humano, entre los más estudiados está el cáncer de colon y recto (CCR), en el que se ha identificado al gen *K-ras* mutado en el 40 % de casos. Su mutación se ha relacionado con la resistencia a terapias con medicamentos como el Cetuximab y el Panitumumab, que actúan en los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que son los medicamentos de primera línea para tratar al CCR (Orlando y et. al. 2011; Martini et. al. 2017).

Los genes que codifican para RAS son *H-ras* (Harvey), *K-ras* (Kirsten) y *N-ras* (Neuroblastoma), los dos primero se identificaron por primera vez en oncoproteínas de virus de murinos y el otro en una línea celular de Neuroblastoma. Son de los grupos de oncogenes más frecuentemente alterados en las neoplasias humanas (Mammas y et. al., 2003).



El gen de interés es el *K-ras* encargado de participar en la señalización de las vías PI3K/PTEN/AKT y RAF/MEK/ERK, importantes vías en el crecimiento celular (Parker & Mattos, 2017). Se encuentra localizado en el cromosoma 12, codifica para una proteína de 21 KDa (p21), la cual tiene una longitud de 189 aminoácidos, las mutaciones más frecuentes ocurren en los codones 12, 13 y 61 del exón 1 y 2 del mencionado cromosoma, las mutaciones más comunes son G12D, G12V, G12R, G13D, donde G es Glicina, V es Valina, R es Arginina y D es Ácido Aspártico (COSMIC, 2017).

Además de las alteraciones ya mencionadas los mutantes de *K-ras* son capaces de activar la vía EGFR, lo que propicia que la efectividad de los fármacos dirigidos a esta vía se altere, así que los pacientes cuyos tumores albergan tales mutaciones no son candidatos para la terapia anti-EGFR (Orlando y et. al. 2011; Guedes y et. al. 2013).

3.4 Líneas celulares de CaCu

Una línea celular proveniente de un tumor se ha perpetuado de forma in vitro en un laboratorio, se usan para realizar investigación relacionada con caracterización de la enfermedad, respuesta a tratamiento y búsqueda de mutaciones (Tolosa, 2016). Dentro de las líneas celulares de CaCu, podemos encontrar CaSki, C33A, HeLa, RoVa, SiHa y ViBo entre otras. CaSki es una línea proveniente de CaCu la cual hizo metástasis en el tejido del intestino delgado, positivas para VPH 16 y algunas secuencias para VPH 18 (ATTC, 2018; ExPASy, 2018). C33A, proviene de una paciente de 66 años, de carcinoma, negativo para VPH. La expresión de p53 es elevada, y hay una mutación puntual en el codón 273 que da como resultado una sustitución Arg > Cys (ATCC, 2017). HeLa fue la primera línea celular que se logró perpetuar in vitro, en la década de los 50's, de una paciente de 31 años, proveniente de adenocarcinoma, positiva para VPH 18 (ATCC, 2017). RoVa es una línea celular mexicana positiva para VPH 18, extraída de un carcinoma epidérmico (ExPASy, 2017; Monroy & et. al. 1992). SiHa se estableció a partir de fragmentos de una muestra de tejido primario obtenida después de la cirugía de una paciente japonesa, de 55 años, positiva para



VPH 16, de carcinoma de células escamosas (ATTC, 2017). ViBo es una línea celular generada en México la cual es negativa para VPH, obtenida de un carcinoma primario de CaCu (ExpASy, 2017; Monroy & et. al. 1992).

3.5 Técnicas de biología molecular para diagnóstico

Algunas técnicas de biología molecular son usadas en búsqueda de biomarcadores específicos las cuales son consideradas como herramientas adicionales para distinguir y diferenciar tumores con apariencia histológica similar pero de distinto comportamiento, lo que permite mejorar e individualizar los tratamientos de forma integral (Bissada et al 2013), otras pueden utilizarse como por ejemplo en los casos de cáncer de cabeza y cuello para estratificar categorías citológicamente indeterminadas con el fin de decidir sobre su tratamiento quirúrgico en un contexto preoperatorio (Censi y et. al 2017).

3.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica elegante y sencilla que permite la amplificación in vitro del Ácido Desoxirribonucleico (DNA) diana que utiliza DNA polimerasa y dos secuencias de oligonucleótidos, primers o cebadores específicos que flanquean una región de interés. Esta técnica ayuda en la identificación, detección y diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas. La PCR es un proceso cíclico de separación de DNA de doble cadena por desnaturalización a través de calor, hibridación específica de cebadores de oligonucleótidos cortos a DNA monocatenario, y síntesis por DNA polimerasa, cada ciclo duplica la región marcada por las secuencias de cebador, este proceso secuencial es exponencial y va genera hasta mil millones de copias del objetivo en pocas horas (Metzker-Caskey, 2009). Existen diferentes tipos de PCR, como por ejemplo la de punto final, tiempo real, tiempo real con análisis de alta resolución de fusión (Krypuy et al., 2006; Vossen et & al., 2009; Lee y et. al., 2012).



3.5.2 PCR-HMR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa con análisis de Alta Resolución de Fusión (PCR-HRM en sus singlas en inglés) es un método homogéneo y altamente potente para el escaneo de mutaciones en muestras de DNA. Esta técnica está basada en el comportamiento de disociación y detecta pequeñas variaciones en las secuencias amplificadas de PCR por fusión directa. Las muestras también se discriminan de acuerdo con la longitud de secuencia, contenido de Guanina-Citosina (GC) y complementariedad de la hebra. Con el uso de tintes de DNA específicos (fluorocromos), instrumentación de gama alta y software de análisis sofisticado, estas diferencias pueden ser detectadas (Krypuy et al., 2006; Vossen et al., 2009; Lee et al., 2012).

Una PCR tiempo real y HRM se distinguen en que HRM químicamente utiliza fluorocromos más brillantes a concentraciones más altas, los instrumentos de análisis recopilan datos de fluorescencia a una resolución más precisa, y tiene un software mucho más sofisticado de algoritmos y escalamiento de fluorescente (AB, 2009). La DNA polimerasa utilizada en este tipo de reacción deberá tener la característica de ser altamente purificada, para disminuir la posibilidad la formación de productos inespecíficos, de igual manera los tintes utilizados no deberán influir en la eficiencia de la enzima. Estos tintes poseen propiedades ópticas y químicas que permitan una baja fluorescencia de fondo y un alto brillo en presencia de DNA bicatenario, diluidos en un buffer de sales de Magnesio que estabilizan la reacción tolerando las condiciones de ciclado durante la PCR. La búsqueda de mutaciones con técnica HRM ofrece ventajas sobre otras técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (DHPLC) o la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), ya que HRM se hace con un bajo consumo de reactivos (20µl de reacción de PCR por muestra), no se utilizan solventes ni de geles, es un trabajo simple y rápido, no requiere optimización térmica como en el caso de DHPCL, así como un bajo consumo de muestra, lo que permite utilizar el producto de PCR para secuenciación de Sanger si así se desea (TFS, 2016).



Cabe mencionar que el HRM es un proceso post-PCR, durante la PCR se va amplificado la región de interés o aplicación, y a medida que aumenta la concentración del amplicón también aumentará la fluorescencia exhibida por el producto de doble cadena, terminada la PCR seguirá el análisis de HRM, en el cual el amplicón se calentará gradualmente (de 50° C a 95° C aproximadamente), cuando alcanza la temperatura de fusión del amplicón la doble cadena de DNA se desnaturaliza y la fluorescencia se desvanece ya que los tintes intercalantes no tienen a que unirse, y fluorescen a un nivel muy bajo, este fenómeno se representa gráficamente mostrando el nivel de fluorescencia contra la temperatura, generando una curva de fusión. El cambio de una única base en la secuencia de DNA se puede observar ya que se provocan cambios en la curva de fusión, y comparando con una secuencia muestra pueden ser detectadas esos cambios de bases, que se pueden traducir en mutaciones (Erali y et. al. 2008).

3.5.3 Otras técnicas para la búsqueda e identificación de mutaciones

En la actualidad existen diferentes formas de detectar o determinar mutaciones puntuales en los diversos genes involucrados con el cáncer, la técnica estándar de oro para búsqueda y determinación de mutaciones es la secuenciación Sanger de la que se obtiene la secuencia de cada uno de los nucleótidos de un fragmento amplificado, utilizando fluorocromos didesoxi terminadores de la cadena, es una técnica sensible y específica para determinar la secuencia nucleotídica, el inconveniente es que es costosa por lo tanto no es viable como primera opción en la búsqueda de mutaciones pero si indispensable para corroborar la existencia de las mismas. Además de la PCR-HRM se puede realizar la búsqueda con técnicas de pirosecuenciación, PCR tiempo real alelo específicas, PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción) secuenciación de nueva generación y por inmunohistoquímica, aunque existen estudios que correlacionan las diversas técnicas la PCR-HRM resulta ser una de las mejores alternativas en la búsqueda de mutaciones puntuales (Hernández-Losa y et. al. 2011; Ihle y et. al 2014).

4. Hipótesis

La técnica de PCR-HMR es una técnica sensible que permite la identificación de mutaciones, si existe mutación en los codones 12 o 13 del gen *K-ras* en líneas celulares provenientes de CaCu, entonces se podrá detectar por medio de la técnica mencionada.

19

5. Objetivos

5.1 General

- Buscar mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 del gen *K-ras* en líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino.

5.2 Particulares

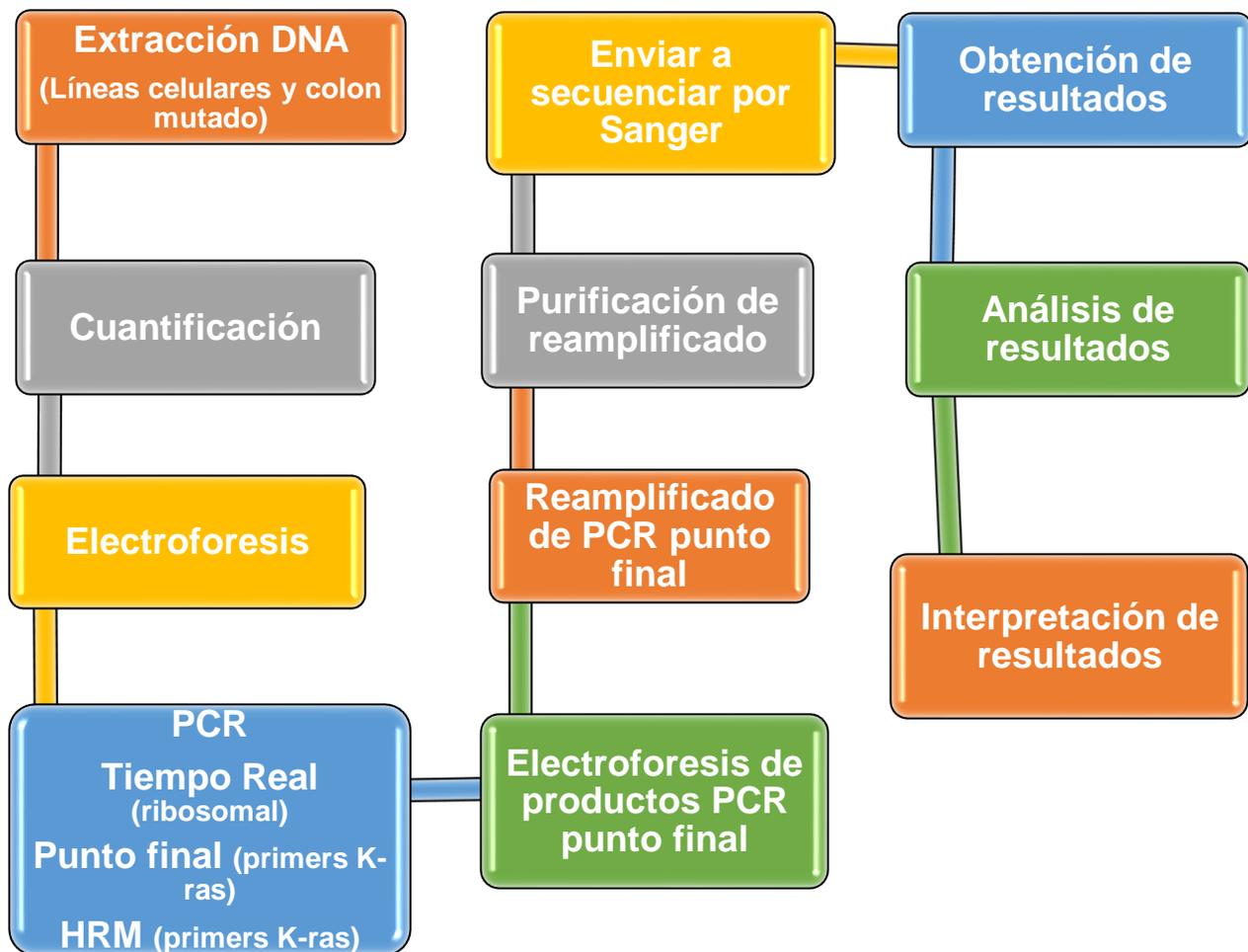
- Implementar la técnica PCR-HMR para la búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *K-ras*.
- Determinar la presencia de mutaciones en los codones 12-13 del gen *K-ras* en las líneas celulares derivadas de CaCu.
- Confirmar la presencia o ausencia de mutación del gen *K-ras* en los codones 12-13 en las líneas celulares de CaCu por secuenciación Sanger



6. Metodología

6.1 Diagrama de flujo de trabajo

20





6.2 Extracción y cuantificación de DNA de líneas celulares y colon

La extracción del DNA genómico se realizó utilizando el protocolo de Proteinasa-Acetato de Amonio, para las seis líneas celulares (CaSki, C33A, HeLa, RoVa, SiHa y ViBo), las cuales fueron donadas por el Dr. Alberto Monroy García. En el paquete celular de cada una de las líneas se agregaron 300 μ l de Buffer de Lisis Nuclear, más 20 μ l de Proteinasa K, a una concentración de 1 mg/ml, se dejaron en termoblock durante 12 horas. Se agregaron 300 μ l de Acetato de Amonio 5M, se mezclaron por inmersión y llevaron por 30 minutos a -20°C , posteriormente se centrifugan a 14,000 rpm por 30 minutos. Se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo, al que se le agregaron 600 μ l de Isopropanol frio, se incubaron durante toda la noche a -20°C . Se descongelaron y se centrifugaron por 15 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante. Se realizaron lavados con Etanol frio al 70%, luego se pasó a centrifugar a 7,500 rpm por cinco minutos, se decantó el sobrenadante, y se resuspendio el botón, con un total de tres lavados, posteriormente se dejó secar el botón en termoblock por tres minutos, se le agregó agua grado biología molecular a un volumen final de 30 μ l. Después, se realizó la cuantificación del DNA en el espectrofotómetro tipo Nanodrop.

Se realizó la extracción del DNA de una muestra de tejido cáncer de colon embebida en parafina, como control positivo, debido a que esta muestra presenta la mutación de interés en el gen *K-ras*. Se hicieron tres cortes de 10 micras del bloque de parafina con el micrótopo Leica RM 2125 con el objetivo de obtener suficiente muestra, se colocan en tubo de 1.5 μ l, se le agregaron 1 ml de xilol y se pasó a termoblock por 10 minutos, se centrifugo a 14,00 rpm por cinco minutos, se decantó el sobrenadante, se repitieron los pasos anteriores en tres ocasiones para desparafinar la muestra. Después del desparafinar la muestra se agregó etanol absoluto, se pasa al agitador por 15 minutos y se centrifugo a 14,000 rpm por 5 minutos, se decantó el etanol y se dejó secar en el termoblock, después se siguieron los mismos pasos de extracción que en las líneas celulares. Se verificó la integridad de las muestras en a través de electroforesis, con un gel de agarosa al 1.5%, con un voltaje de 70 volts por espacio de una hora.



6.3 PCR

Se realizó una PCR Tiempo real con el equipo Step One de Applied Biosystems para corroborar que las muestras fueran amplificables utilizando un constitutivo de RNasa P. Se mezcló el Master mix, agua grado biología molecular y la sonda TaqMan® RNasa P (N° catalogo 4316831 de Applied Biosystems) para 18 reacciones, con un volumen de 99 µl de Master mix, 54 µl de agua y 9 µl de sonda, el Master mix y el agua se mezclaron con pipeta, se resuspendieron con vortex y pulso de centrifugado, inmediatamente se colocó la sonda, se volvió a resuspender la mezcla, posteriormente se prepararon 8 tubos de 0.2 ml, en los cuales se colocó un volumen de 18 µl en cada uno más 2 µl de DNA a una concentración de 150 ng/µl de cada línea celular y del de colon, 2µl de agua para control negativo, teniendo un volumen de 20 µl en cada uno de ellos, se dio vortex y centrifugado, todo esto se manejó en hielo y sin interferencia de luz directa, se puso muestra en las tiras de tubos, usando dos pocillos por muestra, colocando 10 µl en cada uno, utilizando dos tiras de ocho pocillos, se cubrieron con las tapas de tira, se dio vortex y se verificó que no hubiera interferencia de burbujas, se metieron las tiras en el termociclador Applied Biosystems, corriendo en el programa de tiempo real con el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo		
95°C	10 min	}	Etapas 1 (x1)
95°C	15 seg		
60°C	60 seg	}	40 ciclos

Se realizó PCR punto final con primers que amplificaron la región de interés utilizando los siguientes primers:

Secuencia K-ras 12-13 (Forward)



5' GTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGG 3'

Secuencia K-ras 12-13 (Reverse)

3' TTTACCTCTATTGTTGGATCATATTC 5'

(Orlando et al., 2011)

Se prepararon las muestras para la reacción con un volumen total de 20 µl por muestra, esto es, cada una de las líneas celulares, muestra de colon y control negativo. Como primer paso se puso en un tubo Eppendorf de 0.2 ml, 8 µl de agua en el negativo y 7 µl en el positivo y muestras, posteriormente 10µl de Master Mix (Cloruro de Magnesio, Buffer de carga, Enzimas y dNTPs), se agregó un 1µl de los Primes o iniciadores específicos para gen *K-ras* (codón 12-13) a 10 picoMolar, este fue el último paso para el control negativo, se agregó un 1µl de cada muestra una concentración de 150 ng/µl. Se realizó la PCR punto final en el Termociclador con el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	
94°C	5 min	
94°C	30 segundos	} 35 Ciclos
49°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Se revisa el producto de la PCR punto final de *K-ras* por medio de Electroforesis, con un gel de Agarosa al 2%, con un voltaje de 100 volts por 30 minutos.

6.3.1 Reamplificado de productos PCR

Se realizó el reamplificados de los productos de PCR punto final de *K-ras*, con la variante de volumen en la muestra y el agua, se colocan 5 µl de muestra, ajustando el volumen de agua para tener 20 µl de volumen total, de master mix y de primers el volumen es el mismo al descrito en el primer protocolo. Se vuelve a corroborar con electroforesis el tamaño de amplicón.

6.4 Purificación

Para la purificación se utilizó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, el cual consiste en un sistema de purificación por columnas. A cada muestra reamplificada se le agregó en un tubo de 1.5 ml el reactivo Membrane Binding Solution (igual cantidad al del volumen de la reacción del reamplificado), se mezclaron y se pasó cada uno a un tubo de minicolumna SV inserto en tubo recolector, se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto, se llevó a la centrifuga a 14, 000 rpm por un minuto, se desechó el recolector, el minicolumna SV se colocó en otro recolector, se realizaron lavados con Membrane Wash



Solution (Etanol) agregando un volumen de 700 μ l en cada tubo, se centrifugo por un minuto, se repitió el procedimiento pero ahora con volumen de 500 μ l centrifugando por 5 minutos, se pasó el tubo de minicolumna en un tubo de 1.5 ml, se le agregó 50 μ l al tubo de minicolumna para liberar el DNA, se incubo durante un minuto, se centrifugo por un minuto. Después de la purificación se cuantificó el DNA obtenido en Nanodrop.

25

6.5 PCR-HRM

La PCR-HRM se realizó haciendo un Master mix con Melt Doctor™, agua (grado biología molecular) y los primers, para 18 reacciones, mezclando 90 μ l de Melt Doctor con 54 μ l de agua, se resuspendieron con vortex y pulso de centrifugado, se colocaron 9 μ l de cada primer (Forward y Reverse) a 10pM, volviendo a resuspender, se prepararon ocho tubos de 0.2 ml, se colocaron 18 μ l en cada uno, más 2 μ l de DNA de cada muestra y 2 μ l de agua para el control negativo, se dio vortex y centrifugado, todo esto se realizó en hielo y sin interferencia de luz directa, se colocaron 10 μ l en cada pocillo de las tiras de cartucho, dos pocillos por muestra, utilizando dos tiras de ocho pocillos, se taparon, se dio vortex y se verificó que no hubiera burbujas, se colocaron en el termociclador y se corrió el programa de HRM con una Tm de 50°C, seleccionando Step One, con los siguientes tiempos:



Temperatura	Tiempo		
50°C	2 min	}	Etapa 1 (x1)
95°C	10 min		
95°C	15 seg	}	Etapa 2 (40 ciclos)
50°C	60 seg		
95°C	15 seg	}	Curva de Fusión (x1)
50°C	60 seg		

7. Resultado

7.1 Extracción y cuantificación de DNA de líneas celulares provenientes de CaCu y colon

La siguiente imagen muestra la integridad de los productos obtenidos de la extracción de DNA de las líneas celulares provenientes de CaCu y la muestra de colon con mutación en el gen K-ras.

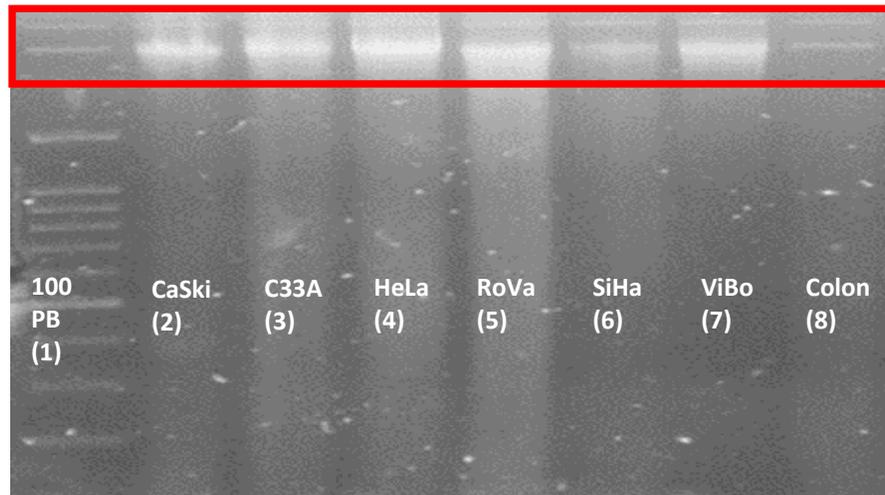


Figura 6. Gel de Agarosa al 1.5% después de Electroforesis de líneas celulares y muestra de Colon. En el recuadro rojo se pueden apreciar las bandas correspondientes al DNA extraído, el primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases, los siguientes seis son cada una de las líneas celulares, y el del final (8) es el DNA de la muestra de colon, la cual se aprecia un poco más tenue debido a la naturaleza de muestra, ya que ésta estuvo embebida en parafina.

La cuantificación de la extracción del DNA de cada una de las líneas celulares y de la muestra de Colon se muestra en esta tabla:

Tabla 1. Cuantificación de DNA líneas celulares provenientes de CaCu y Colon

Línea	260/280*	260/230**	ng/μl
CaSki	1.87	2.27	1941.0
C33A	1.87	2.24	1888.8
HeLa	1.88	2.01	1620.0
RoVa	1.84	2.16	3175.9
SiHa	1.84	2.32	2083.7
ViBo	1.90	2.18	2721.9
Colon	1.83	2.11	2319.4

*Cociente de la longitud de onda del DNA (260) y longitud de onda de proteínas (280)

**Cociente de la longitud de onda del DNA (260) y longitud de onda de sales (230).

La cuantificación de ácidos nucleicos por métodos espectrofotométricos como en el caso del Nanodrop aprovecha las propiedades de tensión superficial de la muestra, con un pequeño volumen de la misma, a través de medición de absorbancia permite hacer la cuantificación de los ácidos nucleicos, en los gráficos de análisis se puede hacer una valoración de la calidad de las muestras ya que permite medir la contaminación de reactivos residuales. Los siguientes gráficos son las imágenes espectrales representativas de la cuantificación de DNA hecha a las líneas celulares provenientes de CaCu y colon.

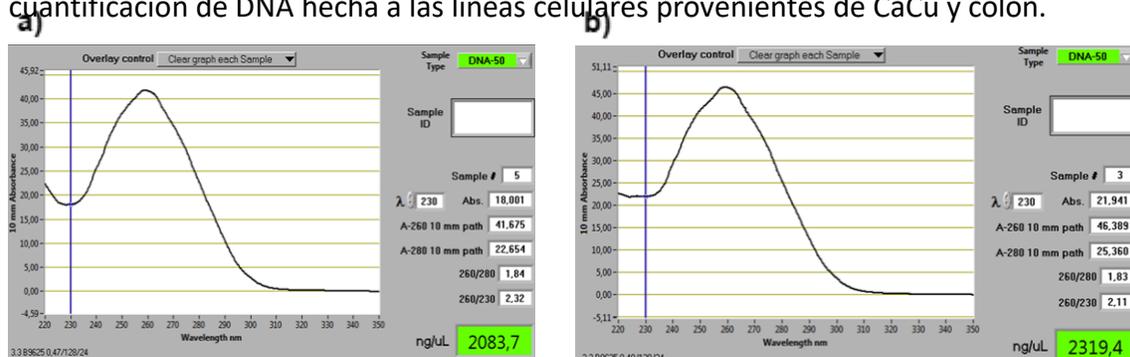


Figura. 7 Imágenes tomadas del Nanodrop de la cuantificación de DNA de SiHa (a) y de la muestra de colon (b). Estos gráficos representan la proporción de la concentración de las muestras, así como su pureza, el rango estimado de concentración es aproximadamente de 1.8 (260/280) y el de pureza de 2 (230/260), que en ambos casos es aceptable, así como en el resto de las cuantificaciones, además de que el cambio de canal de absorbancia se ve a partir de los 230 nm,

rango adecuado que indica el valor esperado sin contaminantes residuales. Los valores de cada una de las líneas se pueden ver en la tabla 1.

7.2 PCR tiempo real de las líneas provenientes de CaCu y colon

Para la evaluación de las muestras a utilizar, se realizó la PCR tiempo real con el constitutivo ribosomal (RNasa P), lo que indico que las muestras eran amplificables (figura 8).

29

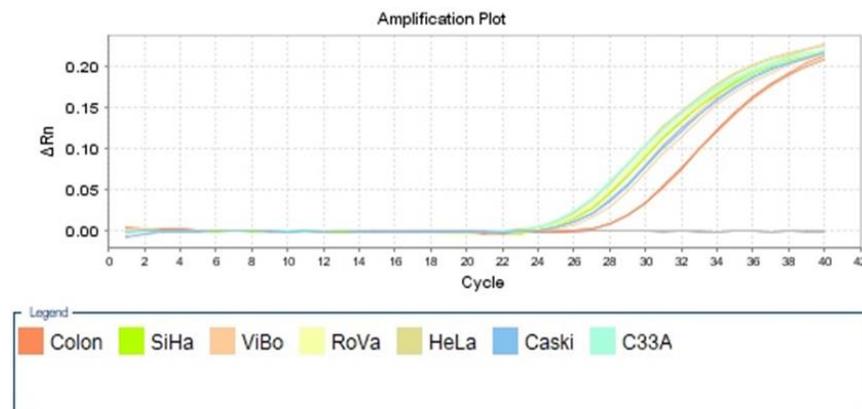


Figura 8. Gráfico de amplificación. Gráfico tipo lineal el cual muestra el crecimiento de producto amplificado durante la PCR tiempo real, la fluorescencia del colorante está representada en el eje de las y, en el de las x se muestra el número de ciclos, durante los primeros ciclos no se registra fluorescencia, lo que se conoce como ruido, a partir del ciclo 28 empieza a registrarse el incremento de fluorescencia, mismo que corresponde a la amplificación de los productos de las muestras.

7.3 PCR punto final del gen k-ras en líneas celulares provenientes de CaCu y colon

Después de la PCR punto final se corrió un gel de agarosa al 2% mostrado en la siguiente imagen (figura 11), para la evaluación del tamaño de ampliación.

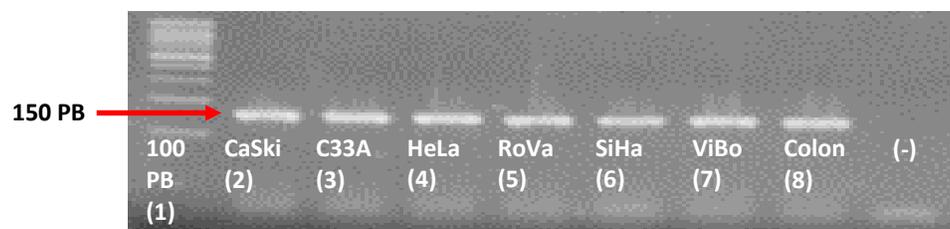




Figura 9. Productos de PCR con primers para gen Kras El primer carril corresponde al marcador de pares de bases, seguidas las líneas celulares, después colon y al final control negativo. El tamaño de la ampliación es el esperado 150 pares de bases, se amplifican las siete muestras a ese tamaño, con única banda y el control negativo no ha revelado banda de amplificado.

7.4 Cuantificación de la purificación del reamplificado de DNA del producto de PCR punto final de líneas celulares provenientes de CaCu y colon

Los resultados de las cuantificaciones del reamplificado de DNA se muestran en la tabla dos, mismos que se enviaron a secuenciar por Sanger (prueba gold standar de validación).

31

Tabla 2. Cuantificación de DNA purificado de los productos de PCR punto final con primers para gen *K-ras*

Línea	260/280*	260/230**	ng/ μ l
CaSki	1.88	1.39	45.4
C33A	1.83	1.71	45.5
HeLa	1.94	1.67	46.0
RoVa	1.90	1.72	41.1
SiHa	1.91	1.67	39.7
ViBo	1.87	1.59	39.7
Colon	1.91	1.28	36.4

7.5 PCR-HRM del gen *K-ras* en líneas celulares provenientes de CaCu y colon

La curva de alineamiento de fusión es parte del análisis de los datos brutos de la PCR-HRM, en la cual se puede ver el nivel de fluorescencia contra la temperatura, lo que permite medir el punto de nivel de fusión del DNA, del estado bicatenario al monocatenario, o bien el punto en el cual la fluorescencia alineada es del 50%. En la figura 10 se muestra el grafico obtenido de la PCR-HRM.

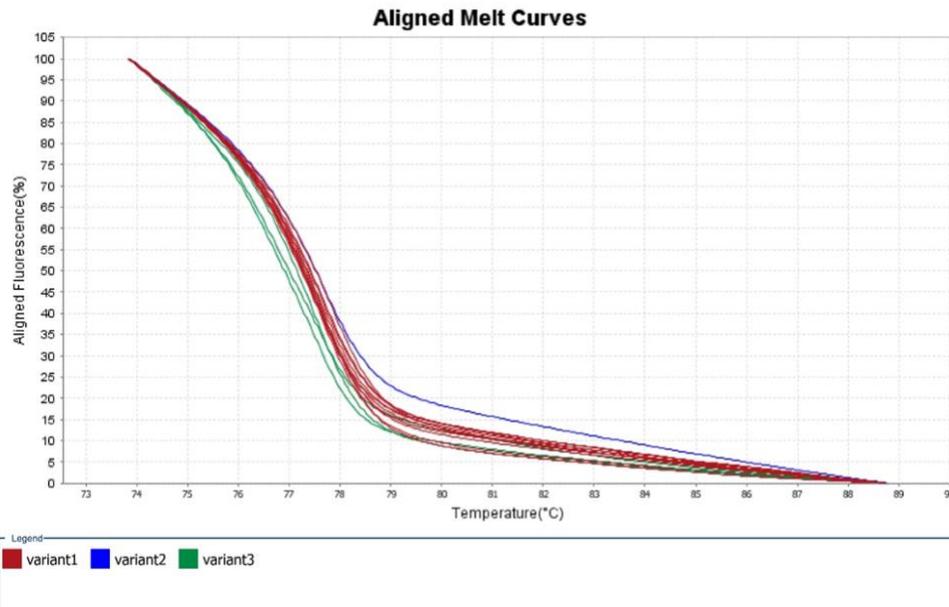


Figura 10. Curva de alineamiento de fusión. Esta curva se genera cuando el colorante unido al DNA, a temperaturas bajas presenta una alta fluorescencia, a medida que la temperatura aumenta el DNA se desnaturaliza y libera el colorante, la velocidad de disminución de fluorescencia es máxima cercana a la T_m . La variante roja corresponde a el trazado generado por las líneas celulares provenientes de CaCu y la variante verde corresponde a la muestra de colon, las cuales tienen un alineamiento de fluorescencia del 50% con un grado de diferencia en la temperatura.

Otro dato importante en el análisis de datos es el diagrama de diferencia de datos, en el cual se introducen algoritmos de alineación más complejos generando una vista de trazado más detallada y a escala que permite visualizar las pequeñas diferencias y discriminar las variantes, la figura 11 es el diagrama obtenido durante el HRM de las muestras de líneas celulares provenientes de CaCu y de colon.

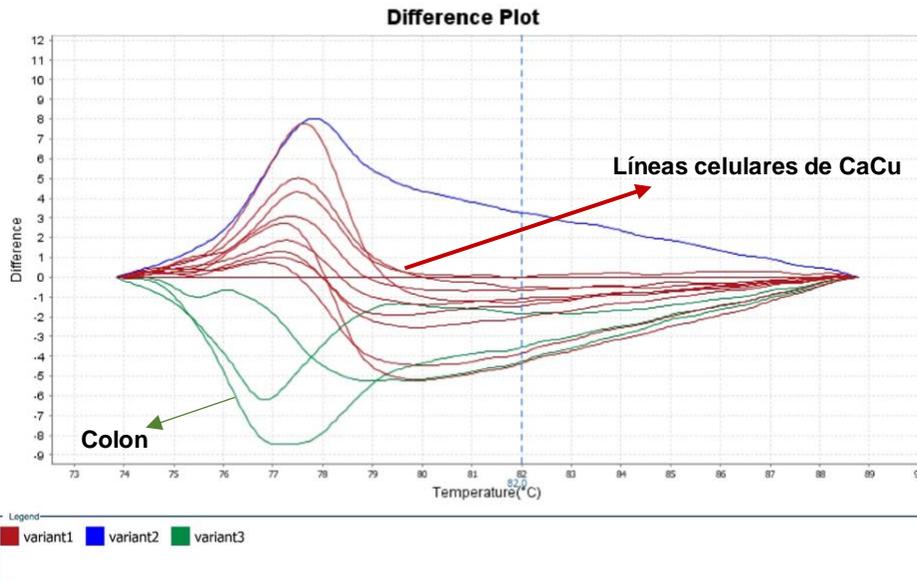


Figura 11. Diagrama de diferencia de datos del análisis de HRM de las líneas celulares provenientes de CaCu y colon. En este grafico los datos de restas mostrando las diferencias de curvas por encima y debajo del cero del eje de las ordenadas, en las abscisas se muestra la temperatura, con lo cual es clara la diferencia de comportamiento entre las líneas celulares y la muestra de colon con mutación en el gen *K-ras*.

7.6 Secuenciación Sanger

Después del purificado de las PCR punto final las muestras se enviaron a secuenciar por el método de Sanger, de los que se obtuvo la secuencia de cada una de ellas tanto de los primers forward como reverse, los cuales se muestran a continuación en la tabla 3, las cuales fueron corroboradas por blast en NCBI, indicando que las secuencias corresponden al gen *K-ras*.



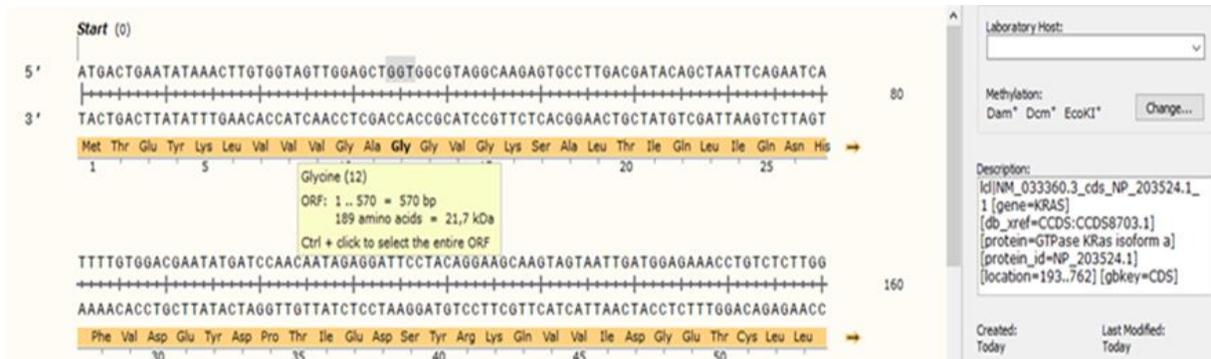
Tabla 3. Secuenciación de líneas celulares provenientes de CaCu y de colon

Colon	Forward: CAAACGAAGTGGCCCTTCGACGATACAGCTMYTTYWTKAATCRTTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAA (80 Bases)
	Reverse:TKAWWWTYTTSAAATTWARCTKGTWTCGTCAAGGMACTCTTGCCTACGCCAYCAGCTCCAACCTACCACAAGTTTATTCAGTCATTTTCA GCAGGCCCTATAATAAAAAAATGAAAATGTGAC (125 Bases)
CaSki	Forward:AAAAAWKGMICYGAATAWAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTMATTCAKAATCATT TTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAA (123 Bases)
	Reverse:NNNNN (0 Bases)
C33A	Forward:GKAATGAAGTATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGT GGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAA (121 Bases)
	Reverse:TRAWWYKYKRAATWARCTGTAWCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCACCAGCTCCAACCTACCACAAGTTTATATTYWGTCATTTTCAGC AGGCCCTATAATAAAAAAATGAAAATGTGACA (123 Bases)
HeLa	Forward:TAATGAMTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGG ACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAA (118 Bases)
	Reverse:ARAWWYCYGGAWWAAGCTGTWWTCGTMAGGCACTCTTGCCTACGCCACCAGCTCCAACCTACCACAAGTTTATTTCAKTCATTTTCA GCAGGCCCTATAATAAAAAAATGAAAATGTGACA (124 Bases)
Rova	Forward:CKSSKRAAAWKRACTGATWTAACCTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTWTTTTCAGAATC ATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAA (127 Bases)
	Reverse:CYTMMTYKWWCYAWMTYTTCCACGAGGCCTTATAATAAAAAAATGAAAATGTGAC (58 Bases)
SiHa	Forward:GKGAAWGGACTTGAATAWAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTMATTTCAGAATCA TTTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAA (125 Bases)
	Reverse:GKGAAWGGACTTGAATAWAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTMATTTCAGAATCA TTTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAAA (125 Bases)
ViBo	Forward:GKAATKACTGATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTG GACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAA (119 Bases)
	Reverse: CCTTAACCCMWCAAGGTTTATATTYCWGTCATTTTTCAGCAGGCCTTATAATAAAAAAATGAAAATGTGACAC (74 Bases)

Las secuencias fueron leídas y alineadas con el programa de software SnapGene Viewer 4.1.7, el cual es un programa de acceso libre en internet, disponible para sistemas operativos como Windows y macOS entre otros, que permite examinar documentos de secuenciación en distintos formatos, importar secuencias desde GenBank, diseñar primers e identificar marcos de lectura. La figura 12 corresponde a la secuencia del gen K-ras wild type (WT) o tipo salvaje, del lado izquierdo aparecen las primeras 160 pares de bases de la

secuencia del gen y del lado derecho una breve descripción arrojada por el programa de la localización del mismo en NCBI, tipo de proteína y número de referencia.

WT



35

Figura 13. Secuencia WT del gen *K-ras* ubicado en el cromosoma 12. En la imagen se aprecian las primeras 160 pares de bases de la secuencia wild type del gen tomada de NCBI, leído con el programa SnapGene Viewer 4.1.7, en el exón 1 se encuentran los codones 12 y 13, que en dicha posición tiene una secuencia que corresponde a la Glicina (GGT-GGC).

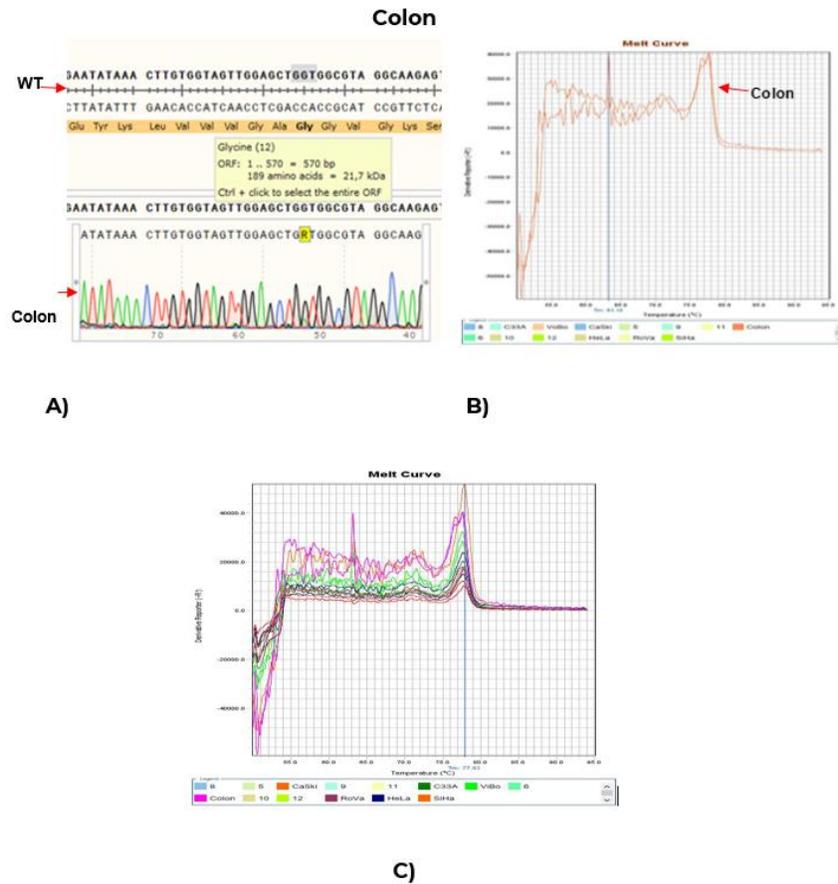
Utilizando el mismo programa de SnapGene se leyeron las secuencias enviadas por el laboratorio de secuenciación, las cuales fueron entregadas como archivo tipo Applied Biosystems Sequence Trace (.abn), mismas que fueron examinadas con BLAST en NCBI, verificando que correspondieran al gen de interés.



Figura 14. Alineamiento de la muestra de colon y de las líneas celulares con la secuencia wilde type. Leídas con el programa SnapGene Viewer 4.1.7, de lado izquierdo se muestran los nombres de las líneas y de la secuencia wilde type del gen *K-ras*, en el recuadro rojo del centro se muestra la secuencia de los codones 12 y 13, según su secuencia nucleotídica en esta posición se encuentran dos Glicinas, se puede apreciar que existe un cambio de base en la secuencia correspondiente a la muestra de colon. Señalada en el pequeño círculo amarillo y con la flecha naranja, las líneas celulares de CaCu no tienen variación de secuencia en los codones 12 y 13.

Habiendo confirmado el cambio de base o mutación del gen K-ras en el codón 12 de la muestra de colon comparada y alineada con la secuencia WT del gen, se presentan imágenes representativas de las secuencias, de los electroferogramas y de las curvas Melt

obtenidas en la PCR-HRM de colon y de una de las líneas en las figuras 15 y 16 respectivamente.



37

Figura 15. Alineamiento de secuenciación del WT con colon, electroferograma y curva Melt de colon. A) corresponde al alineamiento de la secuencia WT del gen K-ras con la muestra de colon, la cual presenta una mutación en el codón 12 distinguido por un cambio de base, la secuencia debería ser GGT, y es GRT, la R corresponde a una base degradada (Adenina), Por lo tanto, hay un cambio de aminoácido, de Glicina por Ácido Aspártico. B) es la curva Melt de la derivativa de la temperatura con el nivel de fluorescencia la cual se muestra como el punto de inflexión mayor, morfológicamente muestra dos puntos intensos, en comparación con las muestras de líneas celulares provenientes de CaCu con un solo punto de mayor intensidad como se parecía en C).

RoVa

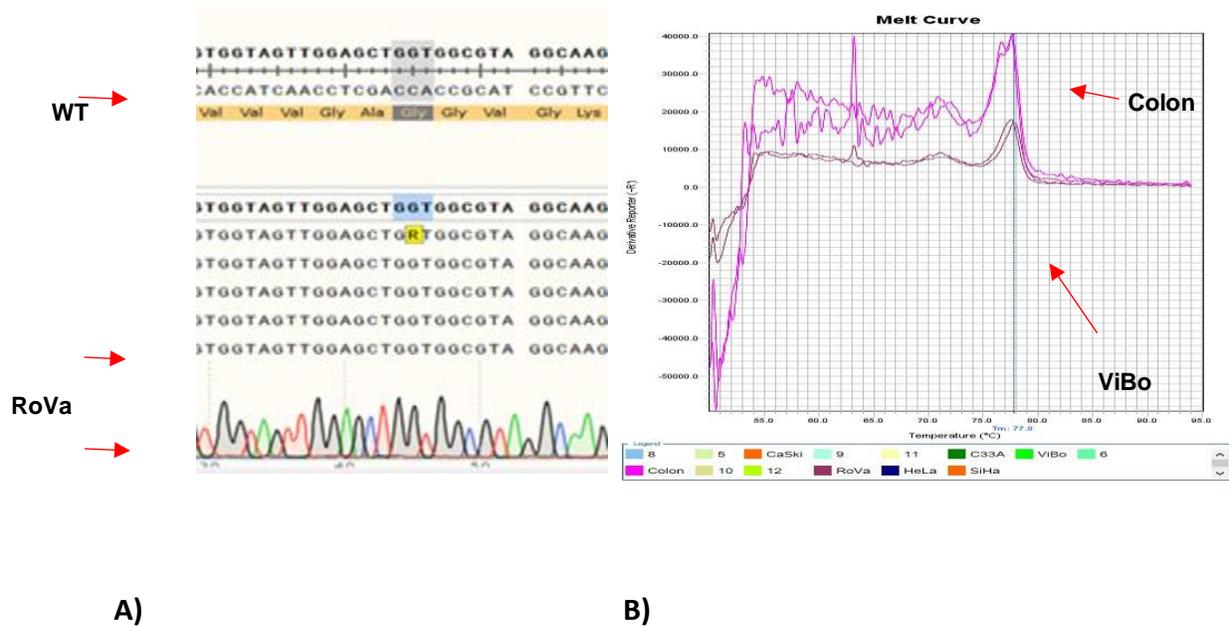


Figura 16. Alineamiento de la secuencia WT del gen K-ras con la línea celular RoVa y curva Melt. A) es el alineamiento de la secuencia de RoVa con el WT, mostrando que no existe cambio de alguno en las bases por lo que se corrobora que no hay mutación en el gen en el codón 12 y 13, en B) se tiene la derivativa de la curva Melt en la cual se muestra un claro cambio en la morfología de la misma ya que la curva de colon mostrada en color magenta tiene un doble pico de intensidad y la de RoVa en color más oscuro muestra solo un punto de mayor intensidad.



8. Discusión

El cáncer uno de los problemas más importantes de salud a nivel mundial, la identificación de alteraciones genómicas está siendo de gran ayuda para establecer terapias personalizadas que permiten mejorar la sobrevida o bien como predictivos a la respuesta de dichas terapias, por lo tanto, contar con herramientas para la identificación de estas alteraciones pone a la vanguardia a los centros de atención médica. En el presente estudio el objetivo fue la búsqueda de mutaciones del gen *K-ras* en seis líneas celulares provenientes de cáncer cérvico uterino, dando como resultado la ausencia de mutaciones en el codón 12 y 13 del mencionado gen, coincidiendo con el estudio realizado por Pochylski y Kwaśniewska en 2003, en el que no encontraron mutaciones del gen en esos codones, para su estudio ellos evaluaron 35 muestras de tejido proveniente de displasias de alto grado y 29 de carcinomas de células escamosas de cuello uterino, contradictoriamente existen estudios que revelan que hay relación entre el VPH y la actividad de RAS en cáncer de cervix como el estudio realizado en 1998 por Dokianakis y colaboradores, ellos mencionan que la mutación de *K-ras* más VPH en un subconjunto de carcinomas cervicales contribuyen a la carcinogénesis en el cuello uterino en las primeras etapas, de igual forma Wegman y colaboradores en 2010 indican que las mutaciones en el gen *K-ras* son poco frecuentes en CaCu pero están asociadas a peor pronóstico y mayor recurrencia que las pacientes con *K-ras* wilde type. En cuanto a la técnica de PCR-HRM utilizada para la búsqueda de mutaciones la evidencia científica comprueba que es una técnica sensible y específica para tal propósito como lo mencionan Ihle y colaboradores en su investigación realizada en 2014 en la que comparan PCR-HRM con otras técnicas en la búsqueda de mutaciones en el gen *BRAF*, estas técnicas fueron, secuenciación por Sanger, pirosecuenciación, PCR alelo específica, inmunohistoquímica y secuenciación de nueva generación, se evaluaron la sensibilidad, especificidad y costos, obteniendo como resultado



que la mejor técnica fue PCR-HRM en la búsqueda de mutaciones. El trabajo realizado en nuestra investigación permitió estandarizar la técnica para búsqueda de mutaciones del gen K-ras, misma que pudiera considerarse para futuros estudios en la búsqueda de mutaciones en otros tipos de cáncer con mayor incidencia de mutación de ese gen en los codones 12 y 13 en específico.

40

9. Conclusiones

En este estudio se planteó la hipótesis de que si existían mutaciones del gen K-ras en los codones 12 y 13 en líneas celulares provenientes de CaCu estas se podrían detectar por medio de la técnica PCR-HRM, por lo cual se puede concluir que no existen mutaciones del gen K-ras en los codones 12 y 13 de las seis líneas estudiadas, se pudo observar la mutación en el control positivo (colon) con la técnica PCR-HRM la cual fue confirmada por secuenciación de Sanger, por lo tanto se sugiere que la PCR-HRM es una técnica sensible y específica para la búsqueda de mutaciones, así mismo que es una técnica relativamente sencilla, rápida y económica comparada con otras técnicas en la búsqueda de mutaciones puntuales.

10. Bibliografía

Applied Biosystems (2009) A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. Extraído desde: www.appliedbiosystems.com

ATCC (2017) C33A. Extraído 4 de diciembre de 2017, desde: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-31.aspx#characteristics>

ATCC (2018) CaSki. Extraído 16 de enero de 2018, desde: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1550>

ATCC (2017) HeLa. Extraído 4 de diciembre de 2017, desde: <https://www.atcc.org/Products/All/CRM-CCL-2.aspx#characteristics>

ATCC (2017) SiHa. Extraído 4 diciembre de 2017, desde: https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Cervix/HTB-35.aspx#documentation

Bissada, E., Abboud, O., Abou Chacra, Z., Guertin, L., Weng, X., Nguyen-Tan, P. F., & Fortin, B. (2013). Prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and impact on clinical outcomes. *Int J Otolaryngol*, 2013.

COSMIC (2017) Gene KRAS. Extraído 23 noviembre de 2017, desde: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=KRAS>

Dell, G. & Gaston, and K. (2001) Contributions in the domain of cancer research: Review Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *CMLS Cell and Mol Life Sciences*. 58: 1923–1942

Dokianakis, D. N., Sourvinos, G., Sakkas, S., Athanasiadou, E., & Spandidos, D. A. (1998). Detection of HPV and Ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncology reports*, 5(5): 1195-1203.



- Dumaz, N., & Marais, R. (2005). Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *The FEBS journal*, 272(14): 3491-3504.
- ExpASy (2018) CaSki. Extraído 16 de enero de 2018, desde:
<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1550>
- ExpASy (2017) ROVA. Extraído 4 de diciembre de 2017, desde:
http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_5166
- García-García, V. y Bascones-Martínez, A. (2009) Cáncer oral: Puesta al día. *Avances en Odontoestomatología*, 25(5), 239-248.
- Granados-García, M. y Herrera-Gómez, A. (2010) Manual de Oncología. Procedimientos Médico Quirúrgicos. Cuarta ed. Mc Graw-Hill. México.
- Guedes, J.G., Veiga, I., Rocha, P., Pinto, P., Pinto, C., Pinheiro, M., Peixoto, A., Maria Fragoso, M., Ana Raimundo, A., Paula Ferreira, P., Manuela Machado, M., Sousa, N., Lopes, P., Araújo, A., Macedo, J., Fernando Alves, F., Coutinho, C., Henrique, R., Santos, L. L. & Manuel R Teixeira, M.R. (2013) High-resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 13:169
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674
- Hernández-Losa, J., Sanz, j., Landolfi, S., López-Ríos, F., Palacios, J., Bautista, M.D., Díaz-Rubio, E., Tabernero, J., García-Foncillas, J. y Ramón y Cajal, S. (2011) Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Revista Española Patología*, 45(2):76-85
- Ihle, M.I., Farssunke, J., König, K., Grünewald, I., Schloak, M., Kreuzberg, N., Tietze, L., Schildhaus, H., Bütter, R. & Markelbach-Bruse, S. (2014) Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer*, 14:13



Iida, K., Nakayama, K., Rahman, M.T., Rahman, M., Ishikawa, M., Katagiri, A., Yeasmin, S., Otsuki, Y., Kobayashi, H., Nakayama, S. & Miyazaki, K. (2011) EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *British J Cancer*, 105: 420–427

Jo's cervical cancer trust (2017) Cervix. Extracted December 1 2017, from:

<https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/the-cervix>

Krypuy, M., Newnham, G. M., Thomas, D. M., Conron, M., & Dobrovic, A. (2006). High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6(1): 295.

Lee, T. H., Wu, T. S., Tseng, C. P., & Qiu, J. T. (2012). High-resolution melting molecular signatures for rapid identification of human papillomavirus genotypes. *PLoS one*, 7(8): e42051.

Luna-Pérez, P., Segura, J., Alvarado, I., Labastida, S., Santiago-Payán, H. y Quintero, A. (2001) Specific c-K-ras Gene Mutations as a Tumor-Response Marker in Locally Advanced Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *Annals of Surgical Oncology*, 7(10):727–731

Mammas, I. N., Zafiropoulos, A., Koumantakis, E., Sifakis, S., & Spandidos, D. A. (2004). Transcriptional activation of H-and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 92(3): 941-948.

Martini, G., Troiani, T., Cardone, C., Vitiello, P., Sforza, V., Ciardiello, D. & Cuomo, A. (2017). Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. *World J Gastroenterol*, 23(26): 4675.

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M. & Candido, S (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and



- PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades, which alter therapy response. *Oncotarget*, 3(9): 954.
- Metzker, M. L., & Caskey, C. T. (2009). Polymerase chain reaction (PCR). *ELS*.
- Miller, M. J., Rioux, L., Prendergast, G. V., Cannon, S., White, M. A., & Meinkoth, J. L. (1998). Differential effects of protein kinase A on Ras effector pathways. *Mol Cell Biol*, 18(7): 3718-3726.
- Monroy, G.A., Rangel, C.R., Rocha, Z.L., Trejo, B.C., Ramírez, G. J., Martínez, R. D., y Weiss-Steider, B. (1992) Establecimiento de siete estirpes de biopsias de cérvix normal y con cancer cervicouterino y sus diferentes contenidos localizaciones desogleína-1. *Rev. Mex. Oncol*, 7:69
- National Cancer Institute (2017) Cervical Cancer Treatment. Health Professional Version. Extracted 11/30/2017, from: <https://www.cancer.gov/types/cervical/hp/cervical-treatment-pdq>
- Orlando, C., Salvianti, F., Pinzani, P., Vinci, S., Simi, L., Pratesi, N., Malentacchi, F., Gelmini, S., & Mancini, I. (2011) Sensitive KRAS Variant Detection by HRM on the ViiA 7 Real-Time PCR System. *Applied Biosystems by Life Technologies*
- Parker, J. & Mattos, C. (2017) The K-Ras, N-Ras, and H-Ras Isoforms: Unique Conformational Preferences and Implications for Targeting Oncogenic Mutants. *Cold Spring Harb Perspect Med*, DOI: 10.1101/cshperspect.a031427
- Pochylski, T., & Kwaśniewska, A. (2003). Absence of point mutation in codons 12 and 13 of K-RAS oncogene in HPV-associated high-grade dysplasia and squamous cell cervical carcinoma. *European J Obstet & Gynecol Reproductive Biol*, 111(1): 68-73
- Rodríguez-Carunchio, L., Soveral, I., Steenberg, R.D.M., Torné, A., Martinez, B., Fusté, P., Pahisa, J., Marimon, L., Ordi, J. y Del Pino, M. (2014) HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*, 122: 119-127



- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590): 890-907.
- Secretaría de Salud (septiembre, 2015) Información Estadística. Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. Extraído 11 de septiembre de 2017 desde <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- Segal, M., Willumsen, B. M., & Levitzki, A. (1993). Residues crucial for Ras interaction with GDP-GTP exchangers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5564-5566
- Thermo Fisher Scientific (2016) MeltDoctor high-resolution Melt (HRM) reagents. Extraído desde: thermofisher.com/hrm
- Tolosa, A. (2016) Importancia de la validación de las líneas celulares utilizadas en investigación. *Genética Medica News*. Extraído 4 dic. 17 desde: <https://revistageneticamedica.com/2016/09/16/lineas-celulares-validacion/>
- Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA). More than just, sequence variant screening. *Human Mut*, 30(6): 860-866.
- Wegman, P., Ahlin, C., & Sorbe, B. (2011). Genetic alterations in the K-Ras gene influence the prognosis in patients with cervical cancer treated by radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer*, 21(1): 86-91.
- Wood, K., Hensing, T., Malik, R & Salagia, R (2016) Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, E1-E8
- Woodman, C.B.J., Collins, S.I. & Young, L.S. (2007) the natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews/Cancer*, 4:11-22
- World Health Organization (Febrero, 2017) Cancer. Media Center. Extraído el 11 de septiembre de 2017 desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>



Wright, A., Howilt, B., Meyers, A., Dahlberg, S., Pelescandolo, E., Hummelen, P., MacConaill, L., Shoni, M., Wagle, N., Jones, R. T., Quick, C. M., Laury, A., Hahn, W. C. Matulonis, U. & Hirsch. M. (2013) oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer*, 119(21)

Zou, Y., Liu, F., Wu, J., Wan, L., Fang, S., Zhang, Z., Lou, Y., Chen, M., Huang, M., He, M. & Huang, O. (2017) Mutational analysis of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway in 260 Han Chinese patients with cervical carcinoma. *Oncology Letters* 14: 2427-2431

11. Figuras

Figura 1A. WebMD (2017) Picture of the Cervix. Extraída 3 de diciembre de 2017, desde: <https://www.webmd.com/women/picture-of-the-cervix#1>

Figura 1B.-Jo's cervical cancer trust (2017) Abnormal cervical cells: CIN and CGIN. Extraída 3 de diciembre de 2017, desde: <https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/cervical-screening-smear-test-and-abnormal-cells/abnormal-cervical-screening-results/abnormal-cervical-cells-cin-and-cgin>

Figura 2. Schiffman, M., Castle, P. E., Jerónimo, J., Rodríguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590): 890-907.

Figura 3. Woodman, C.B.J., Collins, S.I. & Young, L.S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews/Cancer*, 4:11-22

Figura 4. Ulloa, C. (2016) Oncogenes. Extraído 4 de diciembre de 2017, desde: <https://www.slideshare.net/crisulloa07/oncogenes-62638584>

Figura 5. Wood, K., Hensing, T., Malik, R & Salagia, R (2016) Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non–Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, E1-E8