

Detección de mutaciones en oncogenes: aplicaciones diagnósticas y pronósticas

Gabriel Capellá, Alberto Villanueva, Germán Reyes,
Josefina Mora, Miguel Ángel Peinado*, Félix Lluís.

*Laboratori d'Investigació Gastrointestinal. Institut de Recerca.
Servei de Bioquímica Clínica. Hospital de Sant Pau. Barcelona.*

**Departament de Càncer i Metàstasi. Institut de Recerca Oncològica.
Hospital Duran i Reynals. Hospitalet de Llobregat. Barcelona.*

El cáncer puede ser considerado como una enfermedad genética de las células somáticas (1). La transformación neoplásica es el resultado de la acumulación de varias alteraciones genéticas que comportan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales (2,3). Los oncogenes son las formas activadas de genes —proto-oncogenes— que juegan un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación celular normal. Su activación condiciona la aparición de la neoplasia de forma dominante. Los genes supresores tumorales regulan de forma negativa estos procesos y es la ausencia de su función -su inactivación- la que permite el desarrollo de la neoplasia. Son diversas las alteraciones genéticas (vg. translocaciones, amplificaciones, deleciones, mutaciones puntuales) que pueden resultar en la activación de los oncogenes o en la inactivación de los genes supresores tumorales. Las mutaciones puntuales —los cambios en la secuencia de un sólo par de bases— son las que se encuentran con mayor frecuencia. También, son las más sutiles y por tanto las más difíciles de detectar.

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido el avance tecnológico más importante de la biología molecular en los últimos años (4). La PCR permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN gracias a la repetición de múltiples ciclos de desnaturalización del ADN, hibridación con los oligonucleótidos iniciadores y la síntesis del ADN mediante polimerasas termoestables. Este método es extraordinariamente sensible y permite detectar secuencias específicas de ADN o ARN presentes en una sola célula entre un millón de células, aunque el material de estudio no sea de buena calidad. La alta sensibilidad de la técnica puede acarrear consecuencias negativas ya que pueden darse falsos positivos consecuencia de la amplificación de ADN proveniente de otros tubos. La correcta interpretación de los resultados necesita del uso de buenos controles positivos y negativo y requiere del aislamiento de las zonas donde se procesa el ADN nativo de las zonas de análisis de los productos amplificados (revisado en 5,6).

Desde el punto de vista diagnóstico el uso de la PCR ha tenido un especial impacto en áreas como la microbiología al permitir la detección, con alta sensibilidad, de genomas víricos o bacterianos; en la medicina legal al permitir obtener ADN de muestras diminutas; y en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas al permitir el diagnóstico de portador gracias a la amplificación de las células de amniocentesis o de biopsia coriónica (7).

En el campo de la oncología su utilidad se ha centrado en dos situaciones:

a) la identificación de mutaciones presentes en las células tumorales (i. e. translocación de Philadelphia en la leucemia mieloide crónica) tras el desarrollo de metodologías altamente sensibles (8) que han permitido el análisis molecular de muestras obtenidas de forma rutinaria en la clínica (9,10) y han posibilitado su posible aplicación clínica tanto diagnóstica como pronóstica;

b) la detección de células tumorales mediante la identificación de secuencias de ARN específicas de la célula tumoral (i. e. ARN de CEA (Antígeno CarcinoEmbrionario)) cuyo potencial diagnóstico se muestra en muestras donde la mayoría de las células son no tumorales. Esta posibilidad se basa en una de las modificaciones más importantes de la PCR que se realiza sobre cDNA obtenido tras retrotranscripción *in vitro* (RT-PCR) (11). Si el mRNA es específico de la célula tumoral puede identificar la célula con gran sensibilidad ya que puede detectar cantidades mínimas de este transcrito en presencia de millones de células que no lo presentan. Este enfoque se ha utilizado para detectar la presencia de células neoplásicas en sangre periférica en varios tumores: vg. melanoma (12), mama (13) y colon y páncreas (14); así como para incrementar la sensibilidad de detección de células tumorales en ganglios

linfáticos o médula ósea (14) con el fin de estudiar mejor los tumores y seleccionar mejor los candidatos a terapia adyuvante (revisado en 11).

En el presente trabajo analizaremos de forma detallada dos aplicaciones clínicas de la detección de mutaciones en el gen *K-ras* en el diagnóstico del cáncer de páncreas y en el pronóstico del cáncer colorrectal.

1. Diagnóstico molecular del cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas (CP) exocrino es una neoplasia frecuente en nuestro medio. La supervivencia media después del diagnóstico es de 6 meses, y no ha variado en los últimos 30 años por lo que, en la actualidad, el CP es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo occidental (15).

Su localización retroperitoneal motiva una sintomatología tardía y, en ocasiones, inespecífica que dificulta su diagnóstico. Los métodos de diagnóstico por la imagen (ecografía o Tomografía Axial Computarizada (TAC)), que permiten la identificación de masas pancreáticas, son los que proporcionan una mayor eficacia diagnóstica cuando se sospecha CP (16). Tanto la ecografía como la TAC permiten la punción-aspiración percutánea de cualquier masa pancreática y la obtención de un material que posibilita un diagnóstico histológico definitivo en una proporción importante de estos pacientes.

1.1. Mutaciones en el gen *K-ras* en punción aspiración-biopsia de masas pancreáticas

El material obtenido mediante punción aspiración biopsia percutánea de tumores pancreáticos es la primera muestra que se obtiene de este tumor y, a menudo, es el único tejido disponible para realizar el estudio histopatológico. A pesar de la alta sensibilidad del examen citológico del material fresco y en bloque celular, el citopatólogo no siempre puede proporcionar un diagnóstico definitivo.

Los tres miembros de la familia de proto-oncogenes *ras* (*H-ras*, *N-ras*, *K-ras*) son los oncogenes más frecuentemente activados en tumores humanos (17). Son genes altamente conservados a lo largo de la evolución que codifican proteínas de 185-186 aminoácidos ligadas a la membrana (p21). Estas proteínas, que poseen una alta afinidad por GTP y GDP, juegan un papel importante en la traducción intracelular de señales. El potencial maligno de estos oncogenes se activa mediante mutaciones puntuales - cambios de una sola base - en los codones 12, 13 y 61, que condicionan cambios de un sólo AA en la secuencia de la proteína. Estudios previos han demostrado que la

mayoría (60-100%) de los carcinomas de páncreas exocrino en el hombre contienen una mutación en el codón 12 del gen *K-ras* (18,19). La alta incidencia de mutaciones en los tumores del páncreas exocrino sugiere que esta alteración podría ser útil, a nivel clínico, como marcador molecular tumoral a nivel tisular (20). Su detección en lesiones de potencial maligno no conocido (vg. hiperplasia de células mucinosas) ha cuestionado su utilidad como marcador tumoral a nivel tisular (21).

En el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, hemos analizado la utilidad de las mutaciones en el gen *K-ras* en el material obtenido de punciones aspiraciones percutáneas con guía ecográfica o TAC de masas pancreáticas en 93 enfermos atendidos en nuestro centro entre Enero 1985 y Diciembre 1991 (51 H, 42 M; edad media= 62.1 ± 13.3 años). El diagnóstico morfológico se realizó mediante extensión convencional y bloque celular. Las mutaciones en el gen *K-ras* (codón 12) fueron detectadas mediante la técnica de RFLP/PCR que permite detectar la mutación aunque sólo esté presente en un 2-5% de los alelos analizados. El diagnóstico de cáncer de páncreas se estableció si: a) había biopsia quirúrgica positiva para carcinomas o tumores con conocido potencial maligno (vg. adenomas) ; y/o b) muerte durante el primer año desde el diagnóstico con evolución clínica compatible con cáncer terminal. El seguimiento clínico fue completo en todos los enfermos. En 76 de los 93 enfermos (81.7%) se confirmó la existencia de neoplasia. En 4 enfermos se diagnosticaron tumores endocrinos. En 13 casos (17%) el diagnóstico final fue enfermedad no neoplásica (5 pancreatitis crónicas, 6 masas quistes/quistes de desaparición espontánea, 2 pseudoquistes).

La citología identificó células malignas en 46 casos sin falsos positivos, 43 casos fueron dictaminados como negativos (17 verdaderos negativos (VN) y 26 falsos negativos (FN) (15 de ellos con células atípicas)). Se pudo extraer ADN para realizar el análisis de las mutaciones en 88 de los 93 casos (94.6%) (Tabla I). La mutación se detectó en 42 casos (41 carcinomas y 1 cistoadenoma), 46 casos fueron negativos (17 VN y 29 FN). El análisis de la mutación contribuyó al diagnóstico, al confirmar la presencia de células neoplásicas, en 15 casos (13.9%) : 7 de 15 citologías sospechosas, 3 de 22 citologías negativas y 3 de los 4 casos que el patólogo consideró no valorables. Nuestros resultados, obtenidos de una serie amplia, sugieren que la detección de mutaciones en el oncogén *K-ras* puede ser útil como marcador tumoral a nivel tisular ya que puede mejorar la eficacia diagnóstica de la citología en el análisis morfológico de las punciones aspiraciones biopsias de masas pancreáticas, sin falsos positivos. Esta técnica estaría indicada cuando la citología muestra la presencia de células atípicas o aparentemente benignas. En nuestra serie no hemos detectado mutaciones en aspiraciones con hiperplasia de

células mucinosas, una entidad patológica de potencial maligno desconocido (21,22) tal como ha sido previamente descrito en FNA (21,22) o secreciones pancreáticas (22). Estas diferencias pueden ser debidas al tipo de población incluido en los diferentes estudios. La interpretación de los resultados del análisis molecular debe tener en cuenta el resto de información clínica del paciente.

TABLA I.
Sensibilidad y especificidad del diagnóstico citológico y molecular del material obtenido mediante punción y aspiración de masas pancreáticas (*).

	Citología	K- <i>ras</i>	Citología + K- <i>ras</i>
	n=89 ^a	n=88	n=93
Verdadero P	46	42	60 ^c
Falso N	26 ^b	29	16
Sensibilidad (VP/VP+FN)	63.8%	59.4%	78.9%
Falso P	0	0	0
Verdadero N	17	17	17
Especificidad (VN/VN+FP)	100%	100%	100%
Eficiencia (VP+VN/TOTAL)	70.7%	65.9%	83.8%

(*) El análisis de la sensibilidad de la citología fue realizado considerando los aspirados con células atípicas como falso negativos. La especificidad fue calculada sobre 17 casos benignos (13 enfermedades no neoplásicas y 4 tumores endocrinos). Los casos sin material evaluable fueron excluidos de este análisis.

^a 4 casos con material insuficiente.

^b 15 casos con células atípicas (diagnóstico final: cáncer de páncreas).

^c Las mutaciones en el gen K-*ras* contribuyeron al diagnóstico en 14 casos.

1.2. Mutaciones en el gen K-*ras* en otras muestras biológicas: jugo pancreático, sangre periférica y heces

La punción aspiración biopsia implica en la mayoría de los casos la confirmación de un diagnóstico ya tardío. El diagnóstico precoz de la neoplasia de páncreas necesita de exploraciones más sensibles y entre las que tienen mayor potencial destaca el estudio citológico del jugo pancreático obtenido

durante la colangiopancreatografía retrógrada (CPRE). La sensibilidad de la CPRE con estudio citológico del jugo pancreático es del 76% y aumenta hasta el 90% cuando el tumor está localizado en la cabeza de la glándula. Esta técnica supone una alternativa diagnóstica en los casos donde no es posible obtener una punción citológica o una biopsia del tumor.

La sensibilidad de la CPRE con estudio citológico del jugo pancreático puede también incrementarse si se complementa con el estudio genético de la detección de mutaciones del gen *K-ras* (23). Las técnicas habituales de detección de mutaciones para mutaciones en los genes *K-ras* (vg. RFLP/PCR (19), Single Strand Chain Polymorphims (SSCP) pueden detectar mutaciones si están presentes entre un 1-10% de los alelos analizados. Cuando se trata de detectar células neoplásicas en presencia de una cantidad importante de células normales son necesarias técnicas de detección de mayor sensibilidad. Con esta finalidad se han desarrollado diferentes metodologías de alta sensibilidad para la detección de mutaciones basadas en modificaciones de la técnica original de la PCR o en la combinación de técnicas de detección de mutaciones con inmunoestracción de células tumorales. Entre ellas destacan: a) enriquecimiento selectivo del alelo mutado (24), con una sensibilidad de detección de 1 alelo mutado entre 10.000 alelos normales que puede incrementarse, con ciertas modificaciones hasta 1 alelo entre 1 millón (25) ; b) amplificación específica del alelo mutado (26) en condiciones de alta especificidad (Hot Start) (27) que permite la detección hasta 1/50.000; y c) la inmunoestracción con anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos asociados a tumor previa a la aplicación de las diferentes técnicas de detección de mutaciones, con una sensibilidad cercana a 1/100.000 (28).

Utilizando estas técnicas de alta sensibilidad se han detectado mutaciones en el jugo pancreático que han sido el primer diagnóstico de la enfermedad incluso un año antes de poder confirmarlo por métodos convencionales (29). La especificidad de las mutaciones en los genes *ras* para el tejido tumoral ha sido cuestionada por la detección de mutaciones en secreciones pancreáticas de pacientes con hiperplasia de células mucinosas (22,23), una entidad clínico-patológica asociada a la pancreatitis crónica y cuyo potencial maligno es todavía desconocido. En estos pacientes es posible que la detección de mutaciones no sea indicativa de enfermedad neoplásica sino que nos proporcione información sobre el subgrupo de pacientes afectados de pancreatitis crónica que presentan un riesgo aumentado de desarrollar la neoplasia.

Finalmente es importante recordar que mediante estas técnicas ha sido posible detectar mutaciones en muestras obtenidas de forma no invasiva: se

han detectado mutaciones en linfocitos de sangre periférica (27,28), e incluso en plasma de pacientes afectados de cáncer de páncreas (30) lo que abre la posibilidad de confirmar el diagnóstico de la neoplasia de páncreas en presencia de masas pancreáticas sin necesidad de practicar una punción. Además es posible detectar estas mutaciones en células exfoliadas del conducto pancreático identificadas en las heces de estos pacientes (22), lo que constituye una nueva opción para el diagnóstico no invasivo.

En resumen, la detección de mutaciones en el gen *K-ras* ha abierto el camino del diagnóstico molecular del cáncer de páncreas:

a) puede complementar el diagnóstico citológico clásico en el material obtenido mediante punción aspiración biopsia de masas pancreáticas;

b) permite, en un subgrupo de estos pacientes, un diagnóstico precoz del cáncer de páncreas; y

c) es la primera alternativa real al diagnóstico no invasivo de la enfermedad mediante la detección de mutaciones en sangre periférica.

Finalmente, es importante recordar que estos estudios están en constante evolución y que las mutaciones, en un determinado contexto clínico, no estén indicando la presencia de neoplasia (benigna o maligna), sino que nos permitan la identificación de aquellos pacientes con pancreatitis crónica con un mayor riesgo de desarrollar carcinomas de páncreas.

1.3. *ras* en cáncer colorrectal

La tumorigénesis colorrectal es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones moleculares específicas: el oncogén *K-ras*, y como mínimo tres genes supresores tumorales (p53, DCC y APC) están implicados de forma consistente en el desarrollo de estos tumores (3). Aunque, con frecuencia, las alteraciones genéticas ocurren en una secuencia temporal determinada, es la acumulación de las alteraciones más que el orden de adquisición lo que determina las características biológicas de la célula tumoral. Las mutaciones en los genes *K-ras* (40-50%) y p53 (50-70%) son las alteraciones moleculares más frecuentes en el cáncer colorrectal en el hombre (31,32). El oncogén *K-ras* se encuentra activado en una proporción significativa de adenomas colorrectales, las lesiones precursoras del cáncer colorrectal. Si bien la mutación en el gen *K-ras* no es la alteración genética inicial para el desarrollo del adenoma (33), su incidencia aumenta en los adenomas de mayor tamaño y con fenotipo vellosos (34). No obstante, el potencial maligno -el grado de displasia- del adenoma parece estar más relacionado con la presencia de mutaciones en el gen APC que con las mutaciones en el gen *K-ras*

(35). Recientemente se ha definido un tipo de lesión microscópica, los focos de criptas aberrantes (FCA), que podrían representar uno de los estadios iniciales de la tumorigénesis cólica humana (36). Estos focos son criptas aumentadas de tamaño con alteraciones estructurales que se pueden observar en áreas de mucosa aparentemente normal de pacientes afectados de Poliposis Cólica Familiar y cáncer colorrectal esporádico. Se ha demostrado que una proporción variable (13-95%) de estas lesiones contienen una mutación en el codón 12 del gen *K-ras* (35,37,38). Estas observaciones sugieren que los FCA podrían ser lesiones premalignas cuyo potencial de crecimiento (progresión o regresión) dependería del tipo de alteración que adquiriesen durante su evolución (39); las mutaciones en el gen APC serían las responsables de su potencial maligno mientras que el papel del gen *K-ras* es mucho menos claro.

1.4. Utilidad diagnóstica de las mutaciones en el gen *K-ras*

El desarrollo de técnicas de alta sensibilidad para la detección de mutaciones en el gen *K-ras* ha permitido la detección de mutaciones en células exfoliadas de tumores cólicos presentes en las heces, abriendo el camino al diagnóstico molecular no agresivo de la neoplasia (40,41). El hecho de que sólo el 40-50% de los tumores contienen mutaciones hace dudar sobre su utilidad clínica real para substituir la colonoscopia como diagnóstico en el cáncer colorrectal.

Sin embargo, es posible que existan nuevas aplicaciones clínicas de la detección de mutaciones en el gen *K-ras* en heces. La presencia de estas mutaciones en los FCA, e incluso en mucosa microscópicamente normal (42), podrían explicar la detección de mutaciones en el material exfoliado en heces en ausencia de lesiones identificables mediante colonoscopia (43). En un estudio preliminar, se detectaron mutaciones en el material de retorno de enemas de limpieza pre-colonoscopia en 3 de 7 pacientes con historia familiar de cáncer colorrectal con colonoscopia normal. Si asociamos a estos datos la evidencia de que los FCA en pacientes con cáncer poseen una incidencia elevada de mutaciones en el gen *K-ras* (25-95%), se podría especular que la presencia de mutaciones en heces podría ser útil para identificar a los pacientes con riesgo aumentado de cáncer colorrectal que serían tributarios de colonoscopia posterior.

1.5. Utilidad pronóstica de las mutaciones en el gen *K-ras*

La detección de mutaciones en el gen *K-ras* en una proporción tan elevada de pacientes con tumores colorrectales ha abierto la posibilidad de evaluar

su posible utilidad pronóstica. De hecho, la presencia de mutaciones parece condicionar algunos aspectos importantes de la biología del cáncer colorrectal: la presencia de mutaciones en el codón 13 del gen *K-ras* retrasa la secuencia adenoma-carcinoma y la adquisición de mutaciones en el adenoma condiciona su crecimiento y la adquisición del fenotipo vellosa (34). Cuando el carcinoma ya está establecido la presencia de mutaciones se asocia al fenotipo bien diferenciado y a la aparición del componente mucinoso (44).

A pesar de que las mutaciones en el gen *K-ras* parecen tener una clara influencia sobre la biología del cáncer colorrectal, los estudios realizados hasta el momento sobre el valor pronóstico de las mutaciones se caracterizan por ofrecer resultados contradictorios (45-48). No obstante es importante resaltar que todos los estudios encuentran diferencias entre tumores no sólo en función de la presencia/ausencia de mutaciones en el gen *K-ras* sino según el codón en que se encuentren y la naturaleza de la mutación. Finkelstein y cols. evidenciaron que los tumores con mutaciones en el codón 13 no metastatizaban mientras que los tumores con mutaciones de ácido aspártico se asociaban a las metástasis a distancia (45). Benhattar y cols. también demostraron una asociación entre la presencia de mutaciones de ácido aspártico y recidiva tumoral (46). Finalmente, Moerkerk y cols. detectaron transiciones G a A en el codón 12 en el estadio B mientras que las transversiones G a C se concentraban en el estadio Dukes C (47).

Nosotros hemos analizado la utilidad de las mutaciones en los genes *K-ras* y *p53* como factor pronóstico en el cáncer colorrectal en una serie de 102 pacientes con cáncer colorrectal con un seguimiento superior a 5 años. Se excluyeron 11 pacientes con tumores portadores de múltiples errores de replicación (RER+) (*ras* (+)=2/11; *p53* (+)=0/11) ya que estos tumores tienen un comportamiento biológico diferente del resto. Las características de la población seleccionada fueron: edad media=65,1±10,1 ; Dukes: A=20; B=30; C=41; grado de diferenciación: bueno o mod=77; malo=14). Se analizó la presencia de mutaciones en los codones 12 y 13 de los genes *K-ras* y *N-ras* mediante RFLP/PCR (31) y las mutaciones en los exones II-IX del gen *p53* mediante polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) tras amplificación mediante PCR después de la síntesis de cDNA mediante transcriptasa inversa (RT-PCR) (32). El análisis estadístico se realizó mediante comparación de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mediante logrank test. Se detectaron mutaciones en los genes *ras* en 41 de los 90 carcinomas (45,5%). La mayoría de las mutaciones (n=29) se localizaron en el codón 12 del gen *K-ras*, 9 en el codón 13 del gen *K-ras* y 3 en el codón 12 del gen *N-ras*, 48 de 80 tumores (60%) contenían mutaciones en el gen *p53*. En 19 casos se detectaron ambas alteraciones. No se observaron diferencias en la

incidencia de mutaciones según el estadio tumoral (Tabla II). Las mutaciones en los genes *ras* no tenían valor pronóstico en ninguna de las combinaciones estudiadas (*ras* 12,13 (+) vs. *ras* (-) $p=0.084$; NONASP vs. ASP vs. *ras* (-) $p=0.08$) (Tabla III) aunque se observó una tendencia a que los tumores con mutación no aspártico recidivarán antes (Figura 1). Es importante destacar que la inclusión o exclusión de los tumores con múltiples errores de replicación puede condicionar, de forma parcial, la interpretación de los resultados (Tabla III). Las mutaciones en el gen *p53* no discriminan, en nuestro estudio, un subgrupo de tumores con peor pronóstico (*p53* (+) vs. *p53* (-) $p=0.96$). Los tumores que contenían las dos alteraciones tenían peor pronóstico (*ras* (+) *p53* (+) vs. resto $p=0.019$) (Figura 2). En nuestra experiencia sólo la presencia combinada de mutaciones en los genes *ras* y *p53* identifica un subgrupo de carcinomas colorrectales con menor supervivencia, lo que confirma estudios previos (49). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado de forma convincente que la determinación de estas alteraciones pueda ofrecer mayor información que el estadio de Dukes sobre el pronóstico del tumor. Otras alteraciones genéticas, especialmente las pérdidas alélicas en el cromosoma 17 (50,51) y 18 (52), podrían poseer un mayor valor pronóstico independiente del estadio. No obstante, estos resultados deben confirmarse en estudios prospectivos multicéntricos incluyendo un mayor número de casos. Hasta el momento, es probable que sólo podamos considerar la acumulación de múltiples alteraciones genéticas (Fractional Allele Loss) (53) en un tumor como un factor pronóstico útil independiente y que la utilidad de las alteraciones genéticas individuales sea limitada.

TABLA II.

Mutaciones en los genes *k-ras* y *p53* a lo largo de la progresión tumoral.

Estadío de Dukes

	A	B	C
<i>ras</i> (+/-)	9/11	14/16	19/22
(n=90)	(45%)	(46%)	(46%)
ASP	6	8	12
NO ASP	3	4	6
NC	0	2	1
<i>p53</i> (+/-)	9/8	17/10	22/14
(n=80)	(52.9%)	(62.9%)	(61.1%)
<i>ras</i> and <i>p53</i> +	2/20	9/27	8/36
(n=80)	(10%)	(33.3%)	(22.2%)

ASP = Tumores que contienen mutaciones de ácido aspártico en los codones 12 y 13 del gen *K-ras*.

NO ASP = Tumores con mutaciones en los genes *ras* que no son ácido aspártico.

NC = Mutaciones detectadas pero no caracterizadas.

Figura 1: Valor pronóstico de las mutaciones en el gen K-ras en el cáncer colorrectal

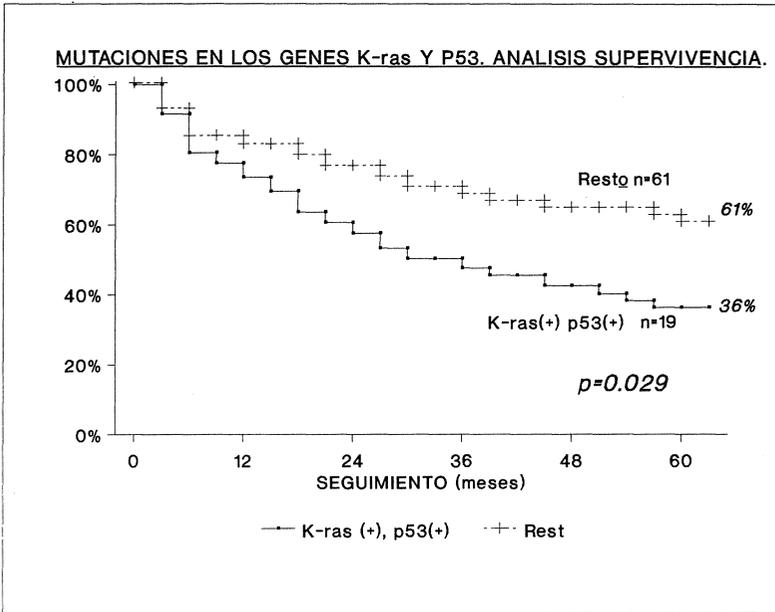


Figura 2: Valor pronóstico de las mutaciones en los genes K-ras y p53 en el cáncer colorrectal

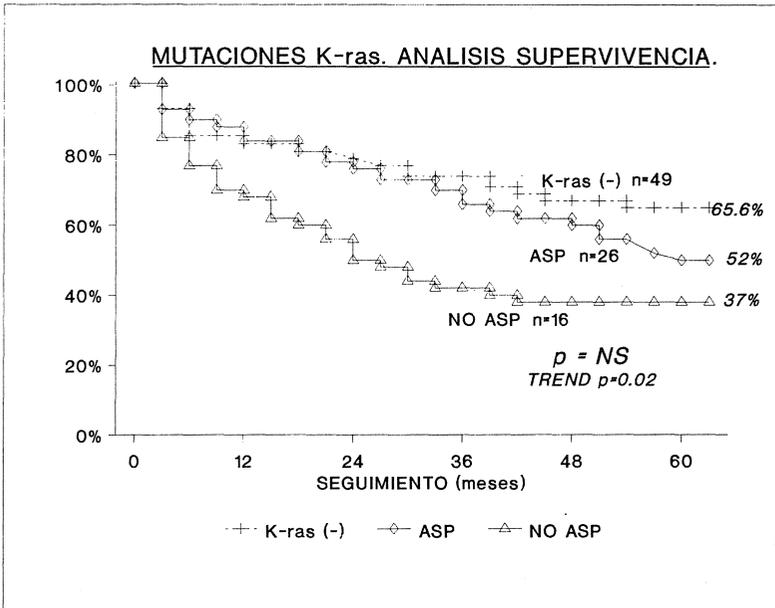


TABLA III.**Análisis estadístico de la supervivencia considerando los tumores con múltiples errores de replicación y sin ellos.**

	TODOS	RER (-)
n=102	n=90	
<i>ras</i> (+) vs, <i>ras</i> (-)	0.056	0.084
NO ASP vs. ASP vs. <i>ras</i> (-)	<u>0.04</u>	0.08
p53 (+) vs. p53 (-)	NS	NS
<i>ras</i>,p53 (+) vs. RESTO	<u>0.042</u>	<u>0.029</u>

2. Referencias

1. Stoler AB (1991). Genes and Cancer. Br Med Bull 47:64-75.
2. Bishop JM (1991). Molecular Themes in Oncogenesis. Cell 64:235-248.
3. Fearon & Vogelstein (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-767.
4. Mullis K, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155:335-350.
5. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA (1990). Theory and applications of the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 93:S49-54.
6. Wright PA & Wynford-Thomas D (1990). The Polymerase Chain Reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J Pathol 162:99-117.
7. Einstein BI (1990). The Polymerase Chain Reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 322:178-183.
8. McCormick F (1989). The polymerase chain reaction and cancer diagnosis. Cancer Cells 1:56-61.
9. Lyons J (1992). The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. Cancer 69:1527-1531.
10. Loda M (1994). Polymerase Chain Reaction-based Methods for detection of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes. Hum Pathol 25:564-571.
11. Nollau P, Jung R, Neumaier M., Wagener C. Tumour diagnosis by PCR-based detection of tumour cells (1995). Scand J Clin Lab Invest 55:Suppl. 221:116-121.

12. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE (1991). Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338:1227-1229.
13. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS (1994). Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12:475-482.
14. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M (1994). Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12:725-729.
15. Silverberg E, Lubera JA. Cancer statistics, 1989. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians* 1989;39:3-20.
16. Niederau C, Grendell JH. Diagnosis of pancreatic carcinoma. Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas* 1992;7:66-86.
17. Barbacid M. *ras* genes. *Ann Rev Biochem* 1987;56:779-827.
18. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *K-ras* genes. *Cell* 1988;53:549-553.
19. Shibata D, Capellá G, Perucho M. Mutational activation of the *K-ras* gene in human pancreatic carcinoma. *Ballière's Clinical Gastroenterology* 1991;4:151-169.
20. Urban T, Ricci S, Grange JD, Lacave R, Boudghene F, Breittmayer F, Languille O, Roland J, Bernaudin JF. Detection of *c-Ki-ras* mutations by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1978-80
21. Yanagisawa A, Ohkate K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent *c-Ki-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993;53:953-956.
22. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of *K-ras* mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994;54:3568-3573.
23. Trümper LH, Bürger B, von Bonin F, Hintze A, von Blohn G, Pfreundschuh M, Daus H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic lesions. *Br J Cancer* 1994;70:278-284.

24. Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kuogoku a, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu A, Yoshida S, Shimosato Y. Detection of point mutations in the *K-ras* oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1994;73:1589-94.
25. Jacobson D & Mills NE (1994). A highly sensitive assay for mutant *ras* gene and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia. *Oncogene* 9:553-563.
26. Stork P, Loda M, Bosari S, Wiley B, Poppenhausen K, Wolfe H. Detection of *K-ras* mutations in pancreatic and hepatic neoplasms by non-isotopic mismatched polymerase chain reaction. *Oncogene* 1991;6:857-862.
27. Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of *ras* gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2472-2474.
28. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, Butler RN, Mi J-X, Sage RE, Dobrovic A. Immunobead-PCR: A technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1993;53:3455-3458.
29. Bouisson M, Berthèley PH, Escorrou J, Vaysse N, Pradayrol L. Analysis of *Ki-ras* mutations in endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) samples. *Gastroenterology* 1993;104:A296.
30. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao S-L (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidem Biomarkers & Prevent* 3:67-71.
31. Capellá G, Cronauer-Mitra S, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the *c-K-ras* gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 93, 125-131, 1991.
32. Peinado MA, Fernandez M, Capellá G, Wilson L, Perucho M. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene in human colorectal tumors: frequency, spectrum and relation with *c-K-ras* oncogene mutations. *Int J Oncol* 2: 123-134, 1993.
33. Schaeffer J, Shibata D, Capellá G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the *c-K-ras* locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 85:1058-63, 1993.
34. Capellá G, Lluís F, Sancho F, Perucho M. Activation of the *c-K-ras* gene in the colon adenoma-carcinoma sequence. *Surgical Forum* XLI: 459-461, 1990.

35. Jen J, Powell SM, Papaopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54: 5523-5526.
36. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51:1564-1567.
37. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC et al: *K-ras* mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 85: 2004-2007, 1993.
38. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S (1994). Somatic APC and *K-ras* codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 54:5527-5530.
39. Fearon E (1993). *K-ras* gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:1978-1980.
40. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B (1992). Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256:102-105.
41. Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W (1995). Detection of c-Ki-*ras* mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 36:81-86.
42. Minamota T, Ronai Z, Yamashita N, et al: Detection of *K-ras* mutation in non-neoplastic mucosa of Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 4:397-401, 1994.
43. Tobi M, Luo F-C, Ronai Z. Detection of *K-ras* mutations in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86:1007-1010, 1994.
44. Laurent-puig L, Olschwang S, Delattre O, Validire P, Melot T, Mosseri V, Salmon RJ, Thomas G (1991). Association of Ki-*ras* mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 49:220-223.
45. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA (1993). Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 71:3827-38.
46. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel J-C, Costa J. Prognostic significance of *K-ras* mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993;104:1044-1048.
47. Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruïne A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-*ras* point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 54:3376-3378, 1994.

48. Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ (1994). The common molecular genetic alterations in Dukes B' and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 59:747-751.
49. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P (1993). Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 104:57-64.
50. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 102:1136-1141, 1992.
51. Offerhaus GJA, de Feyter EP, Cornelisse CJ, Tersmette KWF, Kern SE, Vogelstein B, Hamilton SR. The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 102:1612-1619, 1992.
52. Jen J, Kim H, Piantodosi S, Liu Z-F, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 331:213-221, 1994.
53. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 261:3099-3103, 1989.