

## Tesis de Posgrado

# Estudio de genes expresados diferencialmente en el cáncer de colon humano

Mallo, Gustavo V.

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Mallo, Gustavo V.. (1997). Estudio de genes expresados diferencialmente en el cáncer de colon humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2958\\_Mallo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2958_Mallo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Mallo, Gustavo V.. "Estudio de genes expresados diferencialmente en el cáncer de colon humano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2958\\_Mallo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2958_Mallo.pdf)

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**(DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA)**

**Estudio de genes expresados  
diferencialmente en el cáncer de colon  
humano**

**por: Gustavo V MALLO**

**(Para optar por el título de Dr en Ciencias Biológicas)**

**Director**

**Juan L Iovanna**

**"Unité de Recherches de Physiologie et Pathologie digestives" (U. 315)  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM). Marseille FRANCE**

**1997**

*Dedico esta tesis a mi padre León V. Mallo,  
...porque fue el instigador de mi carácter cuando yo no era capaz  
de verlo. Porque fue él, quien me inició en el Método Científico  
cuando yo no sabía quién era Descartes. Me gustaría pensar que  
mi vida es una extensión de la suya y por eso le dedico este  
trabajo, que no es más que el suyo, como un intento de  
reconocimiento y agradecimiento.*

*Dedico esta tesis a mi mujer Romina,  
...porque este trabajo representa el comienzo de una larga etapa  
que quiero seguir compartiendo con ella.*

*Finalmente, quiero dedicarle esta tesis a la "Communauté 315",  
....porque mi producción científica representa un estado de ánimo,  
fruto del trabajo hecho "en casa"....*

## AGRADECIMIENTOS

A Jean-Charles Dagorn, por haberme permitido entrar, y quedarme, para desarrollar mi tesis, en un ambiente saturado de perfume científico y marcado por el ideal de camaradería y solidaridad que enseña y entrega como herencia.

Agradecer al Dr. Giovanni (Juan) todo lo que aprendí, con sólo unas líneas sería una hipocresía de mi parte. Seguramente será la persona que más marque mi actividad científica futura y de la misma forma dejará una huella enorme en mi personalidad. Jamás conocí una persona más generosa por igual, respecto al trabajo pero, sobre todo, en el plano personal. Es tanto lo que uno puede aprender de él, que una tesis resulta insignificante. La generosidad se esconde detrás de otras de sus características, es curioso, sumamente crítico y arrogante. Básicamente es práctico, inquieto, muy protector, justo y tano. Si Jean-Charles me permitió entrar y quedarme, a él le debo el haber hecho posible por todos los medios que estaban a su alcance. Sin duda, le debo mucho más que un agradecimiento.

A mi compañero de estudios y amigo, desde esa época, Nelson (nel) Dusetti, le agradezco el permitirme conocer a Juan y a la comunidad 315. De nel aprendí todas las manip que sé dentro de la biomol. Estuvo al lado en esos momentos en los que uno necesita hablar y desahogarse lejos de la patria, pero también estuvo en los buenos momentos (lo que uno define como un verdadero amigo).

A HO-HO Recherche por permitirme el acceso a una cultura tan rica y diferente de la mía. Le agradezco su sinceridad y el compañerismo que me dedicó. Gracias también por las pequeñas anécdotas de todos los días (que fueron muchas!).

Al Dr. Fritz Fiedler, del Institut für Anästhesie und Operative Intensivmedizin in Mannheim, Germany, por el tiempo que compartimos y por los proyectos comunes a venir.

A Sophie Vasseur, por la frescura de todos los días, por la cálida amistad que irradia y por la dedicación que pone en su trabajo y en su relación con su "communauté 315". También le agradezco a Emilia Ortiz, la "dura-reblanda" del grupo por todos los servicios de traducción-corrección en los que se me hizo indispensable (como bilingüe), mientras yo aprendía a hablar. Les agradezco a ambas, las playas de los viernes a la noche durante el verano Mediterráneo.

Al Dr. Jean-Claude Lizzitski, de la U. 387 (INSERM Marseille France), por su colaboración en los trabajos sobre la expresión de integrinas y Ron, y por los estudios de migración en HT29.

A la Dra Catherine Farnier, de la U. 387 (INSERM Marseille France), por su disponibilidad con el FACS.

A Patricia Garrido y al Robert (Grimaud) por su excelente asistencia técnica. Más que eso, por sobre todas las cosas, por ese compañerismo de todos los días, por esa sonrisa más que cómplice para el doble sentido y por ese "pastis", tan marsellés. Al Robert, en particular, le agradezco hacerme querer al OM.

A Alan Vazi, por soportarme al comienzo cuando trataba de iniciar diálogos increíbles en un francés incomprensible y por mostrar la cálida, pícaro y generosa fibra marsellesa.

## AGRADECIMIENTOS

Al resto de los "Iovannos": Phillippe Soubeyran (quien colaboró en los estudios *in vivo* de los Cdx y con quien comparto gustos televisivos), Frederico Blanes (uno de esos tipos que verdaderamente hay que conocer), David Malka, Hans Bödeker, Marie-Alix y a Jean-Marc Frigerio (por su ayuda mientras salió el screening diferencial).

A los "Verdier" (Jean-Michel): Claire (por el ping-pong de todos los días), Cathy, Laure, Patricia Dupuy y Bertrand. Gracias por el ambiente de todos los días.

A los que no son ni de aquí, ni de allí: Sandrine y Patrice.

A Andrés Saúl de Luminy. Muchas cosas me unen con Andrés (pintura, fútbol y muchas cenas). Pero sólo le voy a agradecer el sostén informático que me brindó cuando mi fijación por la prolijidad se volvió obsesión.

A la gloriosa FCEyN, sobre todo a aquellas personas que siempre mostraron una capacidad superlativa de responsabilidad para hacer bien su trabajo. Quiero mencionar especialmente a Graciela Chiappini de Tapia, de la Secretaría del Dto de Biología, que me allanó el camino para hacer mi defensa desde el otro lado del charco, y a Mabel, Silvia y Guido del Dto de Alumnos/Graduados, que no sé porque (no creo merecerlo) pero siempre me apreciaron. Quiero agradecer al Dr Claudio Lazzari, la disponibilidad que mostró cuando las conexiones (e-mail) con Graciela se mostraron frágiles.

A Romina, porque sin ella nada de todo esto hubiera ocurrido...

A Leo, Alicia, Carlos y el Orestes que fueron familia a pesar de la distancia.

A Fabián Lloyd, María Esther López (cuti), y JJ López-Costa por todo el apoyo que me dieron cuando decidí venir a Francia y por alentarme a terminar esta tesis. También por los e-mails y los sanos consejos.

Y finalmente a la "red del terror". Esa red informática de dudosa jerarquía que me ayudó a seguir conectado con mis raíces y que perdura desde que nos hacíamos la rata en el secundario (Cristian, Piquito, Finito, Silvina -anexo Pico-, Cocundo, Quello, el Negro y Julito).

## REMERCIEMENTS

A Jean-Charles Dagorn pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et pour m'avoir permis de faire ma thèse dans une ambiance chaleureuse, amicale et solidaire, comme il sait la créer, tout en bénéficiant d'un excellent encadrement scientifique.

Au Dr Iovanna (juan) pour tout ce que j'ai pu apprendre. Ces quelques lignes ne suffiront pas pour lui témoigner toute ma reconnaissance. Il sera sûrement celui qui aura le plus marqué ma carrière scientifique future, tout en laissant une énorme empreinte dans ma personnalité. Je n'ai jamais connu une personne aussi généreuse, tant sur le plan professionnel que personnel. Il est un tel puits de science, qu'une thèse devient insignifiante. Outre cette générosité, il possède de nombreuses qualités: il est curieux, il a un esprit critique et arrogant, mais plus que tout, il a un esprit pratique, inquiet, très protecteur, juste et... "Italien". Si Jean-Charles m'a accueilli dans le laboratoire, c'est à Juan que je dois d'avoir mis tous les moyens en oeuvre pour me permettre d'entrer à l'U315. Sans doute, je lui dois bien plus qu'un simple remerciement.

A mon copain d'études et cher ami, Nelson (nel) Dusetti, je le remercie de m'avoir fait connaître Juan et la communauté 315. Grâce à lui j'ai appris toutes les manip que je connais en Bio Mol. Il était à mes côtés dans ces moments difficiles où on a le mal du pays et besoin de parler, mais aussi il était là dans les bons moments (c'est ça un véritable ami).

A HO-HO Recherche pour m'avoir permis de connaître une culture si riche et différente de la mienne. Je le remercie pour sa sincérité et la camaraderie qu'il m'a offert. Merci aussi pour les petites anecdotes de tous les jours (qui furent nombreuses!).

Au Dr Fritz Fiedler, de l'Institut Für Anästhesie und Operative Intensivmedizin in Mannheim, Germany, pour le temps partagé ensemble et pour les projets communs à venir.

A Sophie Vasseur, pour sa fraîcheur de tous les jours, pour la chaleureuse amitié qu'elle dégage et pour le dévouement dans son travail et envers sa "communauté 315". Je remercie aussi Emilia Ortiz, la "dure-très faible" du groupe, mais aussi la "Mme bilingue" de l'U315, pour tous les services de traduction-correction qui m'ont été indispensables et qu'elle a effectués pour moi lorsque j'apprenais à parler le Français. Merci à toutes les deux pour les plages du vendredi soir pendant l'été Méditerranéen.

Au Dr Jean-Claude Lizzitski de l'U387 (INSERM Marseille France), pour sa collaboration aux travaux sur l'expression des intégrines et Ron, et pour les études de migration des HT29.

Au Dr Catherine Farnier, de l'U387 (INSERM Marseille France), pour sa disponibilité avec le FACS.

A Patricia Garrido et Robert (Grimaud), pour leur excellente assistance technique. Plus que cela et par dessus tout, pour cette camaraderie de tous les jours, pour ce sourire plus que complice lors de nos dialogues à double sens, et pour ce pastis si Marseillais. A Robert, en particulier, je le remercie de m'avoir fait aimer l'OM.

A Alain Vazi, pour m'avoir supporté au commencement quand je tentais de m'engager dans des dialogues incroyables, dans un Français incompréhensible et pour avoir cette fibre Marseillaise si coquine, généreuse et chaleureuse.

## REMERCIEMENTS

Au reste des "Iovannistes": Philippe Soubeyran (qui a collaboré aux études in vivo des Cdx et avec qui je partage les goûts télévisuels), Frédérique Blanes (un de ces gars qu'il faut vraiment connaître), David Malka, Hans Bödeker, Marie Alix et à Jean-Marc Frigerio (pour son aide pendant l'étude du screening différentiel).

Aux "Verdier" (Jean Michel): Claire (pour le ping-pong de tous les jours), Cathy, Laure, Patricia Dupuy et Bertrand. Merci pour l'ambiance de tous les jours.

A ceux qui sont ni d'ici ni de là: Sandrine et Patrice.

A Andrés Saúl de Luminy. Beaucoup de choses nous unissent (peinture, football et beaucoup de dîners). Je voulais juste le remercier pour son soutien informatique qu'il m'a offert alors que mon perfectionnisme tournait à l'obsession.

A la glorieuse FCEyN, surtout à ces personnes qui ont toujours montré une extrême capacité de responsabilité pour bien effectuer leur travail. Je veux mentionner spécialement Graciela, du secrétariat du Dpt de Bio, qui m'a facilité le chemin pour soutenir ma thèse de l'autre côté de l'Atlantique, et à Mabel, Silvia et Guido de la scolarité, qui, je ne sais pas pourquoi (je ne pense pas le mériter) m'ont toujours apprécié. Je veux remercier Dr Claudio Lazzari, pour sa disponibilité lorsque les connexions e-mail avec Graciela étaient difficiles.

A Romina, parce que sans elle rien de tout cela ne serait arrivé.

A Leo, Alicia, Carlos et l'Orestes qui furent ma famille malgré la distance.

A Fabian Lloyd, María Esther López (cuti), et JJ López-Costa pour tout le soutien qu'ils m'ont donné quand j'ai décidé de venir en France et pour m'avoir encouragé à terminer cette thèse. Aussi pour les e-mails et les conseils sains.

Et finalement au "Réseau de la terreur" (red del terror). Ce réseau informatique de hiérarchie douteuse qui m'a aidé à garder le contact avec mes racines et qui perdure depuis que nous séchions les cours du secondaire (Cristian, Piquito, Finito, Silvina -anexo Pico-, Cocundo, Quello, le Negro et Julito).

**El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:**

Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNAs encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan B, Duseti N, Dagorn JC, Iovanna JL. *Int. J. Cancer* (1997) 74: 35-44.

Cloning and expression of the human galectin-4 mRNA, and S-type lectin down regulated in colorectal cancer. Rechreche H, Mallo GV, Montalto G, Dagorn JC, Iovanna J. *Eur J Biochem* (1997) 248 : 225-230.

Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, André F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn JC, Iovanna JL. (1997) (enviado para publicación).



| TEMA  | página |
|---|--------|
| <b>PROLOGO</b>  | 1      |
| <b>INTRODUCCION</b>   | 3      |
| <b>EL CANCER DE COLON</b>   | 4      |
| Etiología y patogénesis   | 4      |
| Manifestaciones clínicas  | 5      |
| Diagnóstico   | 6      |
| Clasificación, pronóstico y tratamiento del cáncer colorectal                           | 7      |
| <i>Screening</i> y prevención   | 8      |
| <b>POLIPOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL</b>  | 9      |
| Incidencia  | 10     |
| Etiología y patogenia   | 10     |
| Diagnóstico y tratamiento   | 11     |
| Los síndromes de poliposis hereditarias   | 11     |
| FAP (Familial Adenomatous Polyposis)  | 11     |
| Síndrome de Gardner   | 12     |
| Cáncer colorectal hereditario no poliposo o síndrome de Lynch                           | 12     |
| <b>BIOLOGIA DEL CANCER COLORECTAL</b>   | 13     |
| Proliferación celular anormal   | 13     |
| Las bases moleculares del cáncer de colon   | 15     |
| Oncogenes y genes supresores  | 15     |
| Deficiencia en los sistemas de reparación y el cáncer de colon                          | 19     |
| Otros eventos asociados al desarrollo de tumores en el colon                            | 20     |
| <b>ESTUDIO DE LA EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES</b>                                     | 21     |
| <i>Differential screening</i> ( <i>screening</i> diferencial en una biblioteca de ADNc) | 23     |
| Construcción de una biblioteca de ADNc  | 23     |
| <i>Screening</i> diferencial  | 24     |
| <i>Screening</i> secundario   | 26     |
| <i>Subtracted cDNA libraries</i> (clonado por sustracción en bibliotecas de ADNc)       | 27     |
| <i>Differential display</i> (PCR con iniciadores arbitrarios)                           | 30     |
| <b>OBJETIVOS</b>  | 33     |
| <b>MATERIALES Y METODOS</b>   | 35     |
| <i>Screening</i> diferencial sobre membranas con clones depositados<br>alta densidad    | 35     |
| Recolección de tejidos  | 35     |
| Preparación de membranas con alta densidad de colonias                                  | 35     |
| Preparación y marcado de sondas complejas   | 35     |
| Condiciones de hibridación  | 36     |
| Cuantificación de las señales de hibridación  | 37     |
| Clonado parcial de distintos ADNc   | 37     |
| Secuenciamiento   | 38     |
| Análisis de la bases de datos   | 38     |
| Clonado y estudio de la expresión de la galectina-4 humana                              | 39     |
| Clonado y secuencia del ADNc de la galectina-4 humana                                   | 39     |
| Recolección de tejidos, Northern y <i>dot blot</i>                                      | 40     |
| Estudio de la expresión de la PAP y las PSP I y II                                      | 41     |
| Recolección de tejidos y Northern <i>blot</i>   | 41     |
| <i>Western blot</i>   | 42     |

| TEMA  | página    |
|---|-----------|
| Inmunoquímica   | 42        |
| Clonado y estudio de la expresión del Cdx1 y Cdx2   | 43        |
| Clonado y secuencia de los ADNc Cdx1 y Cdx2   | 43        |
| Obtención de tejidos y Northern blot  | 46        |
| Estudio de la función del Cdx1 y Cdx2 en el cáncer de colon   | 47        |
| Expresión endógena del Cdx1 y Cdx2 en células HT29  | 47        |
| Inducción por ácido retinoico   | 48        |
| Cultivo celular   | 48        |
| Construcción de líneas celulares estables   | 48        |
| Expresión de Cdx1S, Cdx2S, Cdx1AS, Cdx2AS, Cdx-1S-2S y CAT<br>en células HT29 transfectadas   | 50        |
| Ensayo CAT  | 51        |
| Estudios de proliferación celular <i>in vitro</i>   | 51        |
| Estudios de proliferación celular <i>in vivo</i>  | 52        |
| Análisis por la degradación del ADN   | 52        |
| Detección de la fragmentación del ADN genómico  | 52        |
| Por citometría de flujo o FACS  | 53        |
| Por TUNEL   | 53        |
| Microscopía electrónica   | 54        |
| Análisis de la expresión del Ron por citometría de flujo  | 55        |
| Estudio <i>in vitro</i> de la migración celular por la técnica de la "herida"   | 55        |
| Análisis de las integrinas $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\alpha 6$ , $\alpha v$ , $\beta 1$ y $\beta 4$ por citometría de flujo | 56        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>   | <b>57</b> |
| <i>Screening</i> diferencial  | 57        |
| Expresión diferencial de genes sobre filtros con alta densidad de clones  | 57        |
| Identificación de artificios en la hibridación  | 59        |
| a) secuencias repetitivas   | 59        |
| b) secuencias con poli(A) extensos  | 60        |
| Control de expresión a través de clones conocidos   | 60        |
| Galectina-4   | 65        |
| Introducción  | 65        |
| Localización  | 66        |
| Secreción no clásica de las galectinas  | 67        |
| Ligandos específicos  | 67        |
| Función   | 68        |
| Resultados  | 68        |
| Clonado del ADNc de la galectina-4 humana   | 68        |
| Estudio de la secuencia proteica  | 69        |
| Estudio de la expresión del ARNm de la galectina-4 humana   | 73        |
| Discusión   | 76        |
| PAP y PSP   | 78        |
| Introducción  | 78        |
| Resultados  | 80        |
| Estudio de la expresión de la PAP I, PSP I y PSP II en el cáncer de colon   | 80        |
| Estudio de la expresión proteica de la PAP I y PSP I en el cáncer de colon  | 83        |
| Inmunolocalización  | 84        |
| Discusión   | 84        |

| TEMA  | página |
|---|--------|
| Cdx1 y Cdx2   | 88     |
| Introducción  | 88     |
| Resultados  | 90     |
| Clonado del ADNc de los Cdx1 y Cdx2 humanos   | 90     |
| secuencia del Cdx1  | 90     |
| secuencia del Cdx2  | 90     |
| Análisis de la secuencia de las proteínas del Cdx1 y Cdx2   | 93     |
| Estudio de la expresión del Cdx1 y Cdx2   | 93     |
| Discusión   | 98     |
| Estudio de la función del Cdx1 y Cdx2 en el cáncer de colon   | 101    |
| Introducción  | 101    |
| Resultados  | 101    |
| Expresión endógena del Cdx1 y Cdx2 en células HT29  | 101    |
| Inducción por ácido retinoico   | 102    |
| Estudio de la expresión de Cdx1S, Cdx2S, Cdx1AS, Cdx2AS,<br>Cdx-1S-2S y CAT en células HT29 transfectadas | 104    |
| Estudio del crecimiento de HT/Cdx1S, HT/Cdx2S, HT/Cdx1AS,<br>HT/Cdx2AS, HT/Cdx-1S-2S y HT/CAT             | 105    |
| Aumento de la expresión del Ron en HT/Cdx1AS, HT/Cdx2AS   | 106    |
| Efecto anti-tumoral de la expresión de los genes Cdx <i>in vivo</i>                                       | 107    |
| Resistencia de las células HT29 transfectadas a la inducción de<br>apoptosis por privación de suero       | 109    |
| Efecto de la expresión del Cdx1 sobre las células IEC-6. Estudio<br>ultraestructural                      | 111    |
| Estudio de la migración celular <i>in vitro</i> en células HT29 transfectadas                             | 114    |
| Estudio de la expresión de integrinas en células HT29 transfectadas                                       | 116    |
| Discusión   | 117    |
| Efecto de la expresión de los Cdx sobre el crecimiento en las<br>células HT29                             | 119    |
| Aumento de la sensibilidad a la apoptosis en las células HT/Cdx-1S-2S                                     | 120    |
| Influencia de la expresión de los Cdx en la migración celular   | 121    |
| Expresión de integrinas en las células HT29 transfectadas   | 122    |
| Efecto tumoral <i>in vivo</i> de células HT29 transfectadas en ratones NUDE                               | 125    |
| Estudio de la diferenciación en células derivadas del epitelio intestinal                                 | 126    |
| Conclusión  | 126    |
| <b>CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL SCREENING DIFERENCIAL</b>   | 129    |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | 131    |
| <b>ABREVIATURAS</b>   | 149    |

***PROLOGO***

Aunque durante estos últimos años se avanzó mucho en el área de la genética molecular del cáncer de colon, los resultados encontrados no alcanzan a responder todos los interrogantes planteados por los investigadores sobre esta enfermedad. En este trabajo presento una estrategia distinta para su estudio, basada en la detección y el análisis de los genes expresados diferencialmente en los tumores colorectales. Combinando las ventajas del *screening* diferencial sobre un gran número de clones de una biblioteca parcialmente secuenciada, se obtiene un método sencillo con el que se puede establecer un orden de prioridad para su estudio. Esta prioridad será determinada de acuerdo a los datos de su secuencia y de su expresión.

Aquí muestro, la problemática del cáncer colorectal y la necesidad de nuevos marcadores que sirvan al diagnóstico y/o su terapia y brevemente introduzco a los tres sistemas más comunmente utilizados para el clonado de genes expresados diferencialmente. Luego, describo sucesivamente y en detalle el *screening* diferencial de genes sobre filtros, donde los clones son depositados automáticamente a alta densidad, y presento los resultados obtenidos por esta estrategia. Selecciono de acuerdo a los datos aportados por su secuencia tres clones diferencialmente expresados en la mayoría de los pacientes analizados. De esta forma describo por primera vez las secuencias humanas correspondientes a la galectina-4 y a dos factores homeóticos específicos del intestino (el Cdx1 y el Cdx2). Paralelamente, estudio el rol de una familia de lectinas (PAP y PSP) en el cáncer de colon. Estas moléculas no están expresadas diferencialmente en todos los pacientes estudiados, pero en cambio están íntimamente relacionadas, a través de reportes previos, con el fenómeno del cáncer. De todas las moléculas aisladas, los genes homeóticos merecieron un estudio más en detalle para tratar de esclarecer su posible rol en la invasión y en los procesos metastáticos.

Finalmente expongo mi opinión sobre los alcances de esta técnica para seleccionar clones diferencialmente expresados en el cáncer de colon y la posibilidad de ampliar sus alcances a otras enfermedades o modelos.

Con la intención de ser claro y ordenado en la descripción de los resultados, describo primero el *screening* diferencial sobre filtros con alta densidad de clones y a continuación el clonado y la expresión de la Galectina-4, el estudio de la expresión y localización de la PAP I y las PSP (I y II) y el clonado, la expresión y el estudio del rol de los genes homeóticos Cdx1 y Cdx2 en la progresión tumoral. Los capítulos son descriptos en forma independiente sin ninguna interrelación.

***INTRODUCCION***

El cáncer es, más que nunca, una preocupación médica mayor ya que por extrapolación a índices actuales, se prevé que en pocos años será la primera causa de muerte en los países desarrollados (Boring *et al.*, 1991). En los últimos 15 años, los aspectos básicos de la investigación en cáncer hizo grandes progresos. Estos progresos contrastan con la pobreza en el mejoramiento de su diagnóstico y de su tratamiento. Los médicos insisten sobre la necesidad de mejorar el diagnóstico, ya que es evidente que un cáncer detectado precozmente mejora notablemente su pronóstico. Para el profesional clínico, es necesario obtener de manera rápida y simple la información más completa sobre la naturaleza y evolución previsible de un tumor, a fin de poder guiar la mejor elección terapéutica. Por esta razón la búsqueda de marcadores genéticos del estado canceroso, ha sido y es, de mucho interés.

Actualmente existen pocos marcadores biológicos verdaderamente útiles para el diagnóstico (Williams *et al.*, 1977; Wanebo *et al.*, 1978; Goslin *et al.*, 1980; Deveny *et al.*, 1984; Hine *et al.*, 1984; Minton *et al.*, 1985; Fletcher, 1986; Itzkowitz *et al.*, 1986; Rognum, 1986; Itzkowitz *et al.*, 1990; Sardi *et al.*, 1990; Bates, 1991). Esto quizás se deba a que los ya encontrados no sean el fruto de una búsqueda específica, sino más bien el resultado de encuentros azarosos. Sin embargo, es necesario precisar que la tecnología que permite buscar de forma sistemática los marcadores de un estado canceroso es accesible desde hace poco tiempo. Esta tecnología, basada esencialmente sobre los progresos de la biología molecular, asocia los elementos de ésta disciplina (nuevos vectores, sistemas de amplificación de ADN, etc.) al tratamiento informático. Las inversiones decididas por la comunidad internacional en el cuadro del programa GENOMA, beneficiaron a muchos equipos permitiendo demostrar por primera vez en las ciencias biológicas, la efectividad de un análisis sistemático.



## EL CANCER DE COLON

### Etiología y patogénesis

Por su frecuencia, el cáncer de colon es el segundo tipo, en importancia, en el hombre y el tercero en la mujer en los países occidentales. Mucho se conoce sobre su epidemiología, morfología y genética. Estudios epidemiológicos sugieren que ciertos factores ambientales podrían jugar un rol importante en la patogenia del cáncer de colon. Esto se manifiesta a través de las grandes variaciones en su incidencia entre las diferentes poblaciones. Como regla general, las tasas más altas de tumor colorectal se encuentran en la sociedad occidental, donde las dietas son altas en grasas y bajas en fibras. La rápida homogeneización de las tasas de cáncer colon entre poblaciones inmigrantes comparadas con la población general local (Wogan, 1985), permite argumentar fuertemente que la dieta, entre otros factores ambientales, modula diferencias en la predisposición genética entre los

|  |
|--|
| Aumento de la edad   |
| Enfermedades inflamatorias intestinales  |
| Historia personal de adenoma o cáncer de colon   |
| Historia de cancer de colon hereditario<br><i>FAP</i> (Familial Adenomatous Polyposis) |
| Historia de cáncer genital o de mama   |
| Acromegalia  |

**Tabla I**

diferentes grupos de poblaciones. Este factor podría afectar el desarrollo del cáncer de colon a través de distintos mecanismos: alteración de la flora bacteriana del colon, alteración del tiempo del tránsito gastrointestinal o modulación del reciclado de

los ácidos biliares. Todos estos efectos, podrían aumentar el volumen y el tiempo de exposición a potenciales carcinógenos en el lumen de la mucosa del colon. Otros factores comunes de riesgo (Talley *et al.*, 1990), son mostrados en la **Tabla I**. El cáncer de colon muestra claramente un aumento de su frecuencia en personas de más de 40 años, duplicándose su incidencia por cada década incrementada. Sin embargo existen excepciones donde su incidencia prevalece en individuos de entre 20 y 30 años. Un incremento en el recambio de células de la mucosa podría aumentar el riesgo (por ejemplo, ciertas enfermedades inflamatorias del tracto digestivo, especialmente la colitis ulcerosa y algunos síndromes poliposos hereditarios). El riesgo también está aumentado en individuos con una historia clínica que muestra cáncer previo, adenomas de colon o síndrome de Lynch (cáncer multifocal en otros órganos, especialmente los órganos sexuales en la mujer).

### **Manifestaciones clínicas**

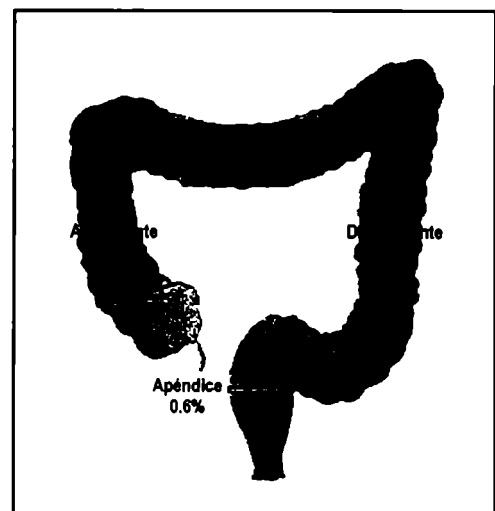
El cáncer de colon, al igual que el de esófago y estómago, tiene muy pocos signos tempranos útiles al diagnóstico y puede ser completamente asintomático hasta que accidentalmente es puesto en evidencia por una cirugía abdominal o una búsqueda sigmoideoscópica de rutina. La manifestación más común es la pérdida de sangre en las deposiciones (Ahlquist *et al.*, 1990), con coloraciones que van desde el negro hasta el rojo, dependiendo de la localización del tumor (negro cuando el tumor es próximal, rojo cuando es distal). El dolor abdominal no es un síntoma común y cuando se presenta puede ser consecuencia de obstrucciones o de invasiones en las paredes del tracto gastrointestinal. Las alteraciones en los hábitos digestivos son síntomas importantes pero no comunes, y frecuentemente resultan de tumores distales. A veces, las diarreas son la consecuencia de obstrucciones

severas pero incompletas de tumores distales de colon. En algunos casos puede ocurrir una pérdida de peso y anorexia, aunque generalmente aparecen tardíamente en el curso de la evolución de la enfermedad (Ahliquist *et al.*, 1990).

### Diagnóstico

Se debe sospechar que existe un cáncer de colon en pacientes de más de 40 años que presentan deposiciones con sangre, anemia por deficiencia en hierro, sangrado rectal o cambio en los hábitos intestinales, especialmente si se asocian a alteraciones abdominales generales o a los factores de riesgo mencionados en la **Tabla I**. Una evaluación diagnóstica debería comenzar con una examinación rectal (palpación digital), sin embargo la mayoría de los tumores colorectales no son palpables, necesitándose exámenes radiográficos o colonoscopías para detectarlos. Actualmente el 50% de los tumores colorectales puede ser identificado a través de un sigmoideoscopio flexible.

La sigmoideoscopia permitió estudiar la distribución de los distintos tipos de tumores (**fig. 1**), encontrándose que estos tienden a localizarse en las zonas más distales (recto y colon sigmoideo). En el caso de realizarse un examen de doble-contraste por enema, con bario, se debe recurrir paralelamente al sigmoideoscopio flexible a fin de detectar los procesos más distales (Reiertsen *et al.*, 1988).



**Figura 1:** Distribución de cáncer de intestino grueso y recto.

La detección del CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) no es de gran ayuda para establecer un diagnóstico de cáncer en el colon, sin embargo es un buen marcador para detectar recurrencia después de la cirugía (Barillari *et al.*, 1989).

En resumen, no existe una manifestación inequívoca ni un marcador eficaz que permitan diagnosticar sin error un cáncer de colon.

### **Clasificación, pronóstico y tratamiento del cáncer colorectal**

En 1929, Cuthbert Dukes propuso una clasificación que fue publicada años después (Dukes, 1932). Posteriormente esta clasificación sufrió numerosas modificaciones. La más usada actualmente es la propuesta por Astler y Coller en 1954 (Astler *et al.*, 1954), según la cual las lesiones de tipo "Dukes A" son confinadas a las paredes del intestino, y en un 80% de los casos se observa una sobrevida de 5 años después de la cirugía; el tipo "Dukes B" es cuando el tumor atraviesa la pared del intestino y la cirugía permite una sobrevida a 5 años entre el 60-80% de los casos; las lesiones de tipo "Dukes C" son aquellas en las que el tumor atraviesa el estrato seroso del intestino, tiene un 50% de sobrevida aún cuando los ganglios linfáticos están involucrados y, finalmente, las lesiones de tipo "Dukes D" son aquellas en las que se observa metástasis generalizada. En este caso la sobrevida a 5 años sólo se observa en un 25% de los pacientes.

La radioterapia es efectiva para el cáncer de recto y podría ser utilizada preoperativamente o para evitar el dolor en la metástasis ósea; sin embargo, la única terapia efectiva es la extirpación quirúrgica del tumor, del colon peritumoral y del mesenterio adyacente (Canis *et al.*, 1996). En la **figura 2** se muestran distintas localizaciones de tumores en el colon y las más frecuentes resecciones practicadas en cada caso. El tratamiento quirúrgico para los carcinomas de intestino grueso da excelentes resultados con una mortalidad aceptable incluso en pacientes de edad.

Aunque, como ocurre con la generalidad de los procesos tumorales gastrointestinales, la sobrevida depende del estado del tumor.

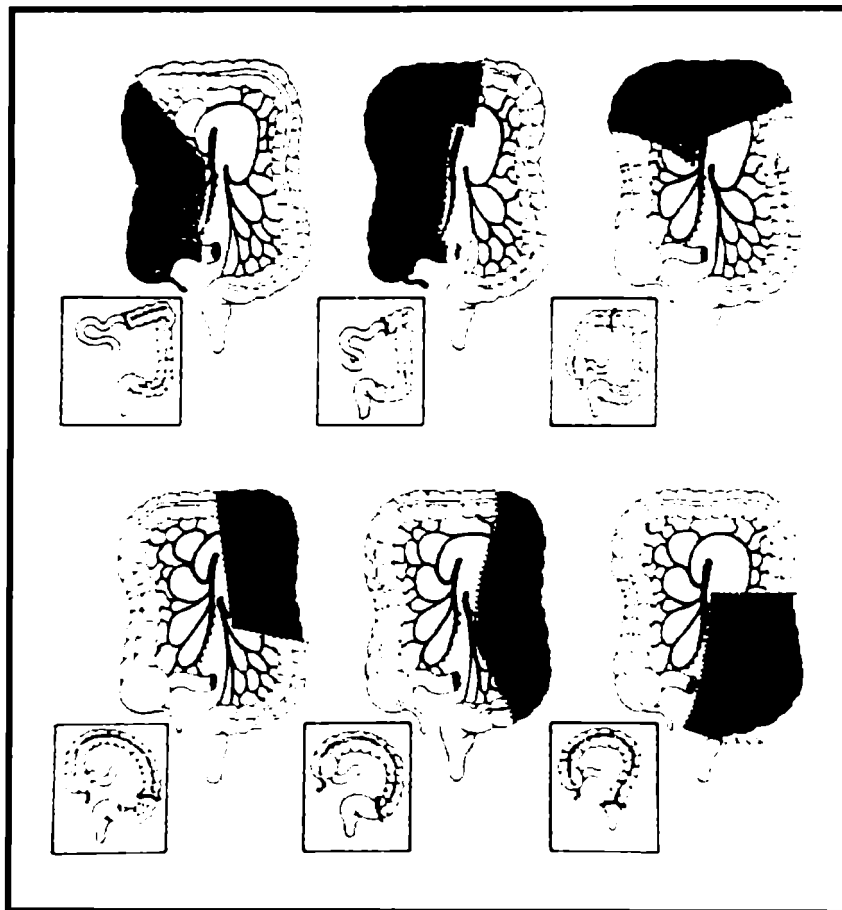


Figura 2: Distintas localizaciones del cáncer de colon y las resecciones usualmente practicadas.

De rutina, los seguimientos post-quirúrgicos se realizan a través de colonoscopías, radiografías con bario o cuantificación de CEA en suero.

### **Screening y prevención**

El complejo mecanismo de la carcinogénesis de colon es tema de estudio desde hace muchos años. Los pólipos adenomatosos y los carcinomas localizados tempranos, pueden ser curados por una polipectomía simple (si técnicamente es posible) o directamente por cirugía. Dada la alta correlación que hay entre los

pólipos adenomatosos y el cáncer, existe un considerable interés en su detección. Para ello se ha propuesto realizar *screenings* sobre la población usando el test de detección de sangre oculta en materia fecal y la procto-sigmoideoscopia cada 3-5 años en individuos con más de 40 años. No está claro si esta estrategia es efectiva, si se tiene en cuenta su relación costo-efectividad (Johnson *et al.*, 1987). Sin embargo, es indiscutible que algunos tumores tempranos se encuentran como el resultado de exámenes de sangre oculta en la materia fecal.

### POLIPOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

|   |
|---|
| <p><b>Pólipos neoplásicos</b></p> <p>Benignos<br/>             esporádicos<br/>             hereditarios</p> <p>Malignos<br/>             carcinogénicos<br/>             invasivos</p> <p><b>Pólipos no neoplásicos</b></p> <p>Pseudopólipos<br/>         Pólipos de la mucosa (con epitelio normal)<br/>         Pólipos juveniles</p> <p style="text-align: center;"><b>Tabla II</b></p> |
|---|

Se define como pólipo, a un sobrecrecimiento de tejido, generalmente epitelial, que se desarrolla a partir de la mucosa y se extiende hacia el interior del lumen del tracto gastrointestinal (adenoma). Los pólipos pueden ser simples o múltiples, esporádicos o

hereditarios, pedunculados o sésiles, neoplásicos o no. Pueden ocurrir en cualquier parte del tracto digestivo, aunque los que aparecen en el colon son los que más llaman la atención debido a su potencial malignidad. Una clasificación simple de los pólipos de colon es mostrada en la **Tabla II**.

### **Incidencia**

Los pólipos adenomatosos del colon son muy comunes, la frecuencia y el número se incrementan con la edad. Una persona de 50 años tiene un 20% de probabilidades de tenerlos, mientras que una persona de 70 años tiene una probabilidad de 30-40%. Los pacientes que presentan un pólipo tienen frecuentemente pólipos de colon sincronizados, y además, una altísima probabilidad de desarrollar otros, en cualquier momento de su vida (Takeuchi *et al.*, 1997).

### **Etiología y patogenia**

El origen de los pólipos de colon es hasta hoy desconocido, excepto los que son hereditarios. Distintas evidencias sugieren, indirectamente, que muchos carcinomas de colon derivan de pólipos adenomatosos benignos, previos (Funariu *et al.*, 1990) después de un período mínimo de 5 a 10 años (podríamos entonces incluir los pólipos adenomatosos benignos como factores asociados al carcinoma de colon en la **Tabla I**). Un porcentaje muy pequeño de pólipos benignos se transforma en malignos y el/los factor/res que causan la transición son hasta ahora desconocidos. Dada la potencial malignidad de los pólipos, es recomendable la extirpación cuando estos son encontrados (Krook *et al.*, 1991). La mayoría de los pólipos son pequeños (menos de 1 cm de diámetro) y en general son asintomáticos, detectados accidentalmente por una radiografía, una colonoscopia o durante una autopsia. Cuando las lesiones son mayores de 2 cm puede haber sangrado. Sólo los pólipos muy grandes que contienen un foco carcinogénico causan hemorragia y dolor abdominal o trastornos en los hábitos intestinales. Éstos son poco comunes. Muy rara vez, los adenomas vellosos de tipo benigno producen diarreas con altas

concentraciones de potasio, la cual resulta en una disminución sintomática de dicho elemento.

### **Diagnóstico y tratamiento**

El tamaño de un pólipo de colon condiciona el diagnóstico exacto. Las enemas de bario (contraste-simple) pueden no detectar pólipos de menos de 1 cm de diámetro, sin embargo, las técnicas por doble-contraste identifican usualmente lesiones de más de 5 mm. Por colonoscopia, se pueden identificar muchos pólipos pero no todos (Landoni *et al.*, 1984). Para diferenciar un pólipo maligno de uno benigno es necesario realizar una biopsia y aunque sólo una pequeña proporción de los pólipos se transforma en malignos, todos los identificados deben ser resecados como medida preventiva. Los métodos comúnmente empleados son la colonoscopia y en el caso de largas lesiones sésiles, puede recurrirse a la extirpación quirúrgica.

### **Los síndromes de poliposis hereditarias**

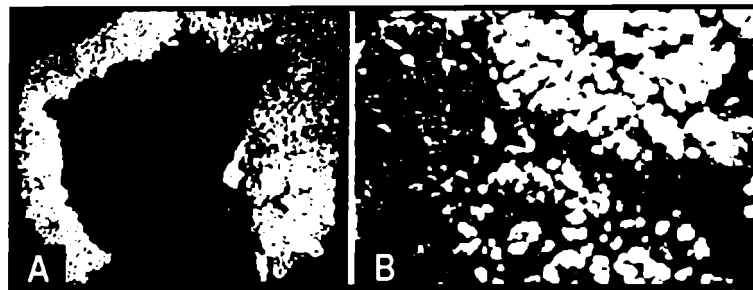
Los síndromes de poliposis hereditarias son desórdenes raros, heredados de forma dominante y en los cuales pueden encontrarse múltiples pólipos a lo largo del tracto digestivo.

#### **FAP (Familial Adenomatous Polyposis)**

Es un desorden genético raro (1 de cada 8000 nacimientos), donde los pólipos adenomatosos se desarrollan progresivamente, hasta que hacia la tercera década de vida tapizan completamente el colon (**fig. 3**). El paciente puede ser completamente asintomático a menos que sufra sangrados. Una consecuencia inevitable en la historia natural de este síndrome es el desarrollo de un cáncer colorectal, y generalmente aparece después de 10 o 15 años del origen de la



poliposis. En los pacientes con un diagnóstico de FAP, se requiere la colectomía completa (usualmente cuando el colon es completamente tapizado) como tratamiento (Tonelli *et al.*, 1997).



**Figura 3:** Familiar Adenomatous Polyposis. A) Los pacientes con FAP tienen múltiples pólipos que tapizan el colon. B) En la ampliación se observan numerosos pólipos de distintos tipos y tamaños.

Teniendo en cuenta que es una enfermedad dominante y hereditaria, todos los miembros de la familia deben ser examinados.

#### Síndrome de Gardner

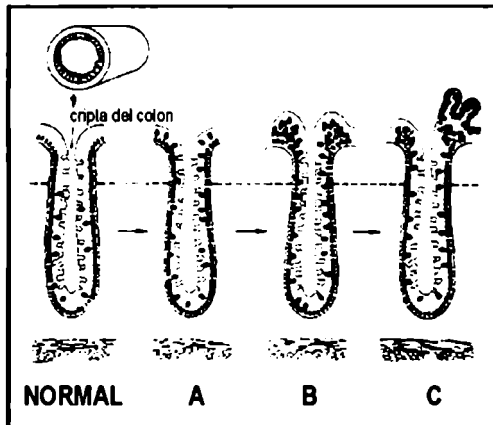
En este síndrome se pueden observar tumores extracolónicos, generalmente en tejidos blandos, y osteomas. A veces, se pueden observar pólipos en la parte superior del tracto digestivo y se requiere una colectomía completa debido a su potencial malignidad (Seruga *et al.*, 1996).

#### Cáncer colorectal hereditario no poliposo o síndrome de Lynch

Algunos autores proponen que el cáncer colorectal hereditario no poliposo o HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) se puede clasificar en dos síndromes, llamados síndrome de Lynch I y II. En el primer caso, la predisposición hereditaria al tumor del colon proximal alcanza el 70% de los individuos de alrededor de 44 años. En el síndrome de Lynch II, un fenotipo similar es acompañado de un alto riesgo de cáncer de endometrio, uréter, pelvis renal, estómago, intestino delgado, ovario y páncreas. Las estimaciones actuales

muestran que su incidencia es de un 6% sobre el total de los cánceres colorectales, y mostró ser asintomático y sin marcadores conocidos (Lynch *et al.*, 1993).

### BIOLOGIA DEL CANCER COLORECTAL



**Figura 4:** Secuencia de eventos en la proliferación anormal de células epiteliales de colon. Las células en negro representan cuerpos en activa división celular. Obsérvese de A a C la progresión, y retención anormal de células epiteliales, definidas patológicamente como una lesión neoplástica (incluida en pólipos y adenomas).

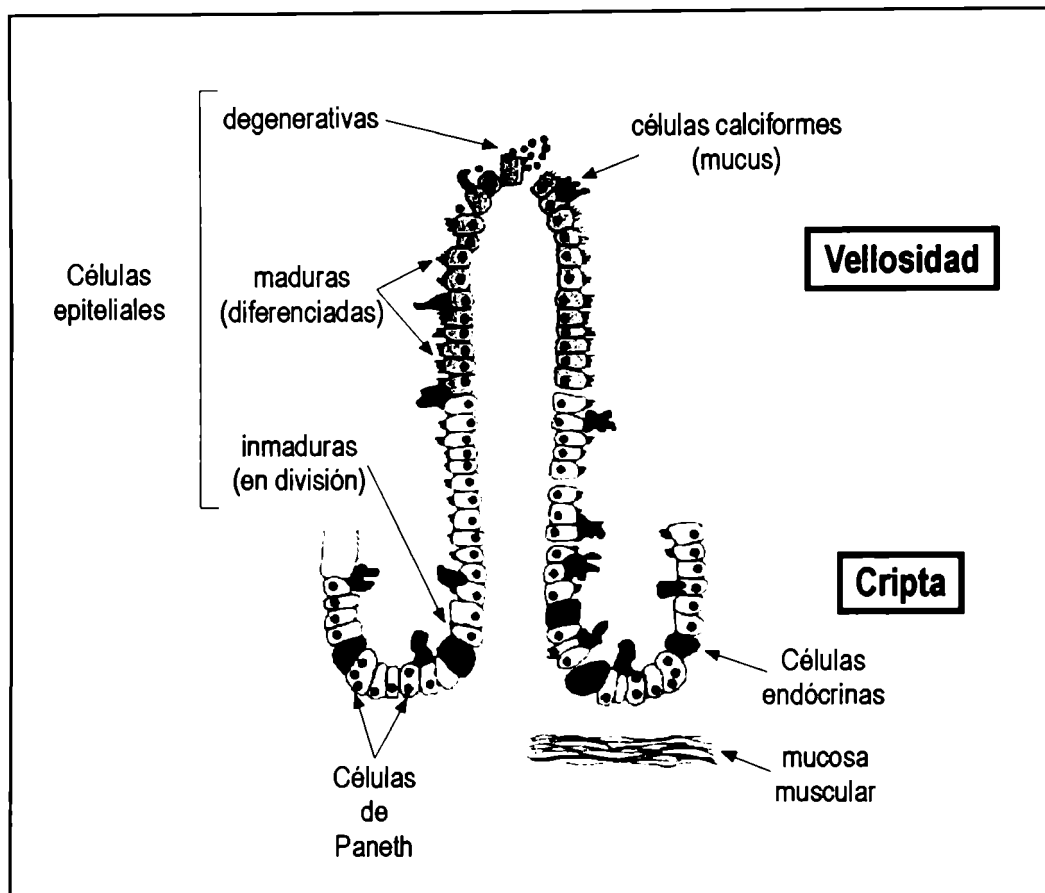
Los conceptos concernientes al entorno ambiental sobre la aparición del cancer de colon han sido discutidos en secciones precedentes. Además de éstos, otros agentes actúan en concordancia con la carcinogénesis (el ácido biliar u otros agentes promotores de tumores) afectando las células epiteliales de la mucosa del colon. Sin embargo, la carcinogénesis es un proceso

complejo que ocurre en más de una etapa (Fearon, 1990a). Las células deben ser genéticamente "activadas", a través de una predisposición hereditaria o de eventos tóxicos, inducidas a proliferar y por último, deben pasar a través de sucesivos estados hasta alcanzar la inmortalidad y el crecimiento descontrolado (fig. 4).

#### Proliferación celular anormal

Las células que proliferan activamente, son más susceptibles a sufrir alteraciones genéticas y de iniciar un proceso cancerígeno (carcinogénesis primaria). En el colon normal, la síntesis de ADN y la división celular ocurren en la región baja y media de las criptas (fig 5). Las células proliferativas migran desde la parte inferior

de la cripta a la parte superior, donde se diferencian en los distintos tipos celulares característicos del epitelio intestinal, cesando en su capacidad de división. Esta secuencia de eventos, está alterada durante la evolución de lesiones neoplásicas en el colon.



**Figura 5:** Descripción histológica (esquema) del epitelio del intestino. En el esquema se representan los cuatro tipos celulares característicos de este tejido: células epiteliales, células calciformes, células de Paneth y células endócrinas.

Fueron reportados desórdenes en la actividad proliferativa de las células del colon, en roedores tratados con agentes químicos carcinogénicos. Un aumento en la actividad proliferativa también se describió en animales cuyo colon es expuesto a ácidos biliares, que promueven tumores (Goldsworthy, 1993). También fue descrita una correlación entre la proliferación de la mucosa rectal y el avance del estado clínico tumoral en pacientes con cáncer no hereditario (Risio *et al.*, 1991).

El mismo fenómeno había sido descrito en otros tumores heredables de colon (Lipkin *et al.*, 1983; Lipkin *et al.*, 1984).

Por último, la ornitina decarboxilasa, una enzima descrita como marcadora de la proliferación celular, está fuertemente expresada en la mucosa intestinal de pacientes con edad avanzada y en pacientes que presentan adenomas (Lans *et al.*, 1991).

### **Las bases moleculares del cáncer de colon**

#### Oncogenes y genes supresores

Estudios de esta última década sugieren que el cáncer colorectal es el resultado del efecto de múltiples mutaciones, las cuales pueden ser heredadas (germinales) o adquiridas (somáticas). Hoy, es evidente que el número total de mutaciones genéticas y, en menor medida, la secuencia en que esas mutaciones ocurre, influencia las propiedades biológicas del cáncer de colon. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre las alteraciones que ocurren a nivel de la expresión de genes durante la aparición y el desarrollo del tumor de colon, sigue siendo extremadamente limitado.

Numerosas observaciones en los últimos años han sostenido la idea de que la carcinogénesis del colon, es un proceso que ocurre en varias etapas, involucrando concomitantemente la activación de oncogenes (genes dominantes) y la inactivación de genes supresores (recesivos). La expresión inapropiada de ciertas proteínas oncogénicas permitiría el desarrollo del fenotipo canceroso. Los proto-oncogenes, sin embargo, juegan un rol en el ciclo normal de la célula, y se ha postulado que su "activación" contribuye a la transformación de la célula a un estado tumoral. Como muchos de esos genes participan en el ciclo normal del crecimiento celular, se estudió si su regulación participa en la carcinogénesis de

colon. Los oncogenes más extensamente estudiados fueron el myc y el ras. El c-myc se encontró aumentado en sólo el 10% de los casos (Meltzer *et al.*, 1987), aunque su expresión incrementada podría ser sólo la consecuencia de la actividad proliferativa más que la causa de una transformación maligna. Los niveles elevados del c-Ha-ras y del c-Ki-ras, fueron descritos tanto en adenomas como en adenocarcinomas de colon, y ciertas mutaciones puntuales (sustituciones) se describieron en el 50% de los cánceres de colon primarios estudiados. Exámenes en lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas muestran, que las mutaciones en el c-ras son un evento relativamente temprano en la transición del adenoma al carcinoma, ya que las mutaciones son previas a la carcinogénesis. Un 10% de las mutaciones en el gen ras, se observan en los adenomas de menos de 1 cm, aumentando a un 58% en los adenomas de más de 1 cm y a un 47% en los carcinomas, sugiriendo que su participación en la transformación es temprana (Vogelstein *et al.*, 1988). El gen ras codifica una proteína membrana de 21 kDa que participa en la transducción de señales. Una alteración de ésta vía podría producir un crecimiento celular anormal y/o participar en la transformación neoplásica. Sin embargo, la relación exacta entre la mutación del ras y la carcinogénesis todavía es especulativa.

Varios tipos de aberraciones cromosómicas se describieron en el cáncer de colon y durante la última década las deleciones de los cromosomas 5q, 17p y 18q se asociaron a distintos tipos de cánceres de colon (Solomon *et al.*, 1987; Vogelstein *et al.*, 1988). Una deleción en el brazo largo del cromosoma 5 (5q) en pacientes con FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), permitió la identificación de la región cromosómica implicada en la enfermedad (Solomon *et al.*, 1987; Bodmer *et al.*, 1987). Estudios sobre cánceres esporádicos de colon, mostraron que entre el 20 y el 35% de los carcinomas espontáneos podían perder precozmente uno de los

alelos que corresponde al cromosoma 5q. Estudios más recientes identificaron un gen que aparece mutado en carcinomas esporádicos de colon, llamado MCC (*Mutated in Colorectal Cancer*), que aparece como un buen candidato a gen supresor en el cáncer de colon y está localizado en 5q21 (Kinzler *et al.*, 1991). Otro candidato denominado APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) fue localizado en la misma región y clonado, mostrando mutaciones puntuales en la línea germinal de pacientes con FAP y síndrome de Gardner, que resultaban en la formación de un codón de fin de secuencia prematuro (Nishisho *et al.*, 1991).

La pérdida de otros alelos también se observa tardíamente en la secuencia de eventos que tienen lugar durante el desarrollo del cáncer de colon (fig. 6).

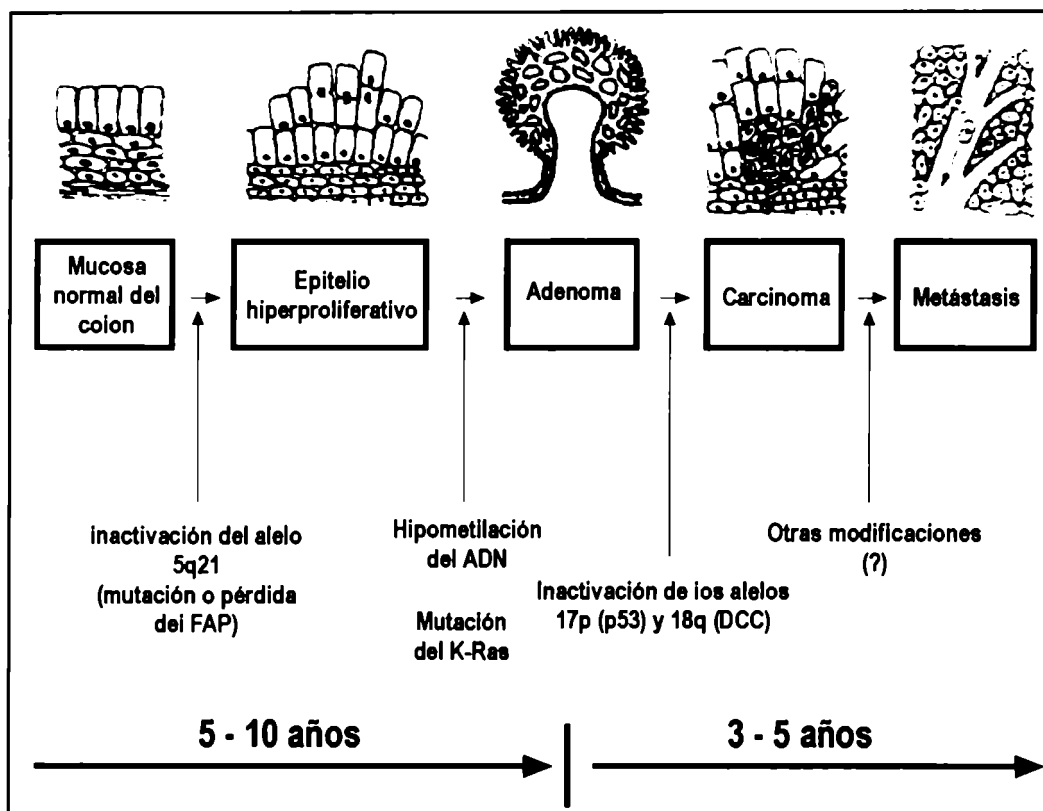


Figura 6: Secuencia de eventos propuestos durante la evolución del cáncer de colon.

Genes supresores de tumor fueron localizados en los cromosomas 17p y 18q y sus deleciones fueron encontradas en un 70 y 80% de los pacientes estudiados respectivamente.

El gen p53 fue ubicado dentro de la zona delecionada en el cromosoma 17p y mutaciones puntuales en dicho gen fueron asociadas con el desarrollo neoplásico (Baker *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990). Otro gen llamado DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) fue localizado en el cromosoma 18q y también sufre mutaciones asociadas al grado de patogenia (Fearon *et al.*, 1990b). La proteína codificada por el DCC resultó tener una homología significativa con la familia de las CAM (*Cell Adhesion Molecules*), en particular con las formas neurales, y con otras glicoproteínas de superficie. Esto permite especular que la alteración de este gen podría estar involucrado en procesos metastáticos del cáncer de colon (Kern *et al.*, 1989). Actualmente el DCC es propuesto como una proteína diagnóstica en ciertos tipos de cánceres colorectales (Shibata *et al.*, 1996), sin embargo, resultados recientes en ratones DCC<sup>-/-</sup>, no muestran alteraciones en el crecimiento, diferenciación, morfogénesis o tumorigénesis de intestino. Estos ratones tienen, en cambio, un fenotipo parecido al de ratones deficientes en netrin-1 (un quimio-atractor axonal), sugiriendo que el gen DCC actúa como un receptor de dicha molécula (Fazeli *et al.*, 1997).

Poco se conoce sobre el conjunto de genes que activan la metástasis y cómo actúan. La **figura 6** resume los eventos en la evolución del cáncer de colon, basado en los datos conocidos. Las alteraciones genéticas asociadas con cánceres de colon esporádicos y con síndromes hereditarios como el FAP sugieren que el cáncer colorectal es el resultado del efecto de múltiples mutaciones germinales o somáticas. Hoy parece claro, que el número total de mutaciones genéticas y la

secuencia en que esas mutaciones ocurre, influencia las propiedades biológicas del cáncer de colon.

*Deficiencia en los sistemas de reparación y el cáncer de colon*

En el curso del año 1993, el estudio de la "expansión y contracción" de secuencias repetitivas en el ADN genómico (microsatélites), llamó la atención sobre una serie de enfermedades hereditarias, incluyendo el cáncer. El estudio sobre la "inestabilidad" de las secuencias repetitivas y el desarrollo de distintas enfermedades humanas tuvo un impacto sorprendente, sobre todo en el cáncer colorectal. La ganancia o la pérdida de ADN en zonas repetitivas, es la consecuencia de errores de deslizamiento durante la replicación, que no son corregidos, por defectos en el sistema de reparación post-replicativo (Ionov *et al.*, 1993; Strand *et al.*, 1993). La inestabilidad de las zonas microsatélites fue significativamente correlacionada con una localización proximal del tumor de colon e inversamente con la pérdida de la heterocigosis para los cromosomas 5q, 17p y 18q, sugiriendo, que otro tipo de cáncer colorectal podría ser la consecuencia de un mecanismo que no involucra la pérdida de cromosomas (Thibodeau *et al.*, 1993).

Paralelamente, el grupo de Bert Vogelstein, en Baltimore (EE.UU.) en colaboración con el grupo de Albert de la Chapelle de Helsinki (Finlandia), realizaron un *screening* sistemático para identificar el locus cromosómico implicado en cánceres tempranos hereditarios del tipo no poliposo (HNPCC) o síndrome de Lynch. Estos autores encontraron que esta enfermedad está asociada a una anomalía en el cromosoma 2p (Peltomaki *et al.*, 1993). Además, compararon los datos obtenidos de estos cánceres con otros esporádicos y no encontraron diferencias entre la incidencia de mutaciones de los genes K-ras, p53 y APC. Tampoco encontraron una pérdida de la heterocigosis para el cromosoma 2. Sin embargo, encontraron sorpresivamente, alteraciones en secuencias repetitivas cortas, sugiriendo que



habían ocurrido errores de replicación durante el desarrollo del tumor (Aaltonen, 1993). En paralelo, todos estos estudios sugerían la existencia de un gen ubicado en el cromosoma 2p, que producía una inestabilidad en el ADN genómico y que estaba involucrado en el desarrollo del cáncer colorectal. Ese gen fue identificado en el transcurso de ese mismo año, resultando ser homólogo a uno de los productos del sistema de reparación de errores MutHLS en *E. coli*, y fue llamado mutS. Mutaciones en su secuencia producen inestabilidades en el ADN similares a las observadas en el síndrome de Lynch (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993). Inmediatamente se clonaron los genes humanos homólogos al mutL (del sistema MutHLS) y se comprobó, igualmente, su participación en la carcinogénesis una vez mutado (Bronner *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Nicolaidis *et al.*, 1994). Los ratones homocigotas <sup>-/-</sup> para el gen humano homólogo al mutS de *E. coli*, sorpresivamente fueron viables, aunque a los 2 meses de edad desarrollaban, con alta frecuencia, tumores linfoides que contenían inestabilidades genómicas en regiones repetitivas (Reitmair *et al.*, 1995).

#### Otros eventos asociados al desarrollo del tumor de colon

La metilación del ADN es una modificación de tipo covalente que ocurre casi exclusivamente en el dinucleótido CG (citosina, guanina), encontrándose normalmente metilado el 70% del ADN de células diferenciadas. Es comúnmente aceptado, que la metilación juegue un rol en la regulación de la expresión del ADN, aunque hasta el día de hoy no es completamente claro cómo y cuál es su verdadero alcance. Muchos estudios han asociado una hipometilación del ADN a la activación de la transcripción (Laird *et al.*, 1994; Cravo *et al.*, 1994), aunque otros muestran que la hipermetilación de regiones específicas en algunos tumores, puede ser asociada a la inactivación de la expresión de genes supresores de tumor (Herman *et al.*, 1995; Jones, 1996). La metilación diferencial también ocurre en los

pólipos benignos y en el tejido canceroso, sugiriendo que esta alteración es un evento muy temprano que probablemente antecede la transformación tumoral (Goelz *et al.*, 1985).

Durante el transcurso de 1996, el gen DPC4 fue descrito como un potencial gen supresor de tumor en el páncreas (Hahn *et al.*, 1996). Este gen se co-localiza en el cromosoma 18q con otros genes supresores, el DCC y el recientemente clonado MADR2 (Eppert *et al.*, 1996). Actualmente se estudia la posible implicación del DPC4 en el cáncer de colorectal (Thiagalingam *et al.*, 1996). Tanto el DPC4 como el MADR2 forman parte de una familia de genes (homólogos al MAD de *Drosophila*), que participan en la transducción de señales como receptores (serina/treonina kinasas) de la familia del TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Recientemente fue demostrado que el TGF- $\beta$  inhibe el ciclo celular en muchas células (Datto *et al.*, 1995). La inactivación, por mutación, de ambos genes (DPC4 y MADR2) podría sugerir que se trata de genes supresores y que podrían actuar a través de una disrupción en la vía del TGF- $\beta$  (Hahn *et al.*, 1996; Eppert *et al.*, 1996).

### ESTUDIO DE LA EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES

Durante los últimos años se trató de entender la aparición del cáncer colorectal utilizando estrategias de genética reversa . Mucho se avanzó, sobre todo, gracias a los trabajos de Bert Vogelstein y sus colaboradores. Sin embargo, actualmente esta estrategia no aporta ningún progreso significativo e incluso comienzan a encontrarse resultados contradictorios respecto a los genes identificados por esta técnica (Fazeli *et al.*, 1997). El mismo Vogelstein, eligió recientemente una

estrategia alternativa, basada en la expresión diferencial de genes para seguir avanzando en la comprensión de esta enfermedad (Zhang *et al.*, 1997).

Críticamente, introduciré los fundamentos de las tres técnicas básicas que permiten el clonado de genes expresados diferencialmente, por ejemplo en el cáncer de colon. El propósito de esta sección es resumir las metodologías actuales para identificar y analizar ARNm expresados diferencialmente en distintas condiciones experimentales o durante el desarrollo de una enfermedad. Básicamente las tres técnicas consideradas son: *subtracted cDNA libraries* (clonado por sustracción), *PCR-based differential display* (PCR con iniciadores arbitrarios) y *differential cDNA library screening* (*screening* diferencial en una biblioteca de ADNc). A través de estas técnicas es posible identificar variaciones en el nivel de expresión de los ARNm de diferentes tipos celulares, o en una misma célula sometida a diferentes condiciones de cultivo. Estas técnicas permiten aislar e identificar los ARNm específicos de un tejido o expresados diferencialmente, sin la necesidad de información o una hipótesis previa, excepto que las dos poblaciones de ARN que se van a comparar sean en efecto diferentes. Una vez aislados los ADNc de los ARNm expresados diferencialmente, pueden ser secuenciados, estudiarse su expresión en diferentes tejidos (o células) y analizarse su función o pueden usarse para la producción de la proteína en bacterias o en células eucariotas. Todas estas aproximaciones permiten estudiar el rol de distintos genes expresados diferencialmente, en el curso de una enfermedad, durante el desarrollo o ante diferentes condiciones de cultivo, en el caso de células.

***Differential screening (screening diferencial en una biblioteca de ADNc)*****Construcción de una biblioteca de ADNc**

Un capítulo importante en un *screening* diferencial sobre una biblioteca de ADNc, es la construcción de la biblioteca, por ello le dedicaré un párrafo especial a los requisitos y cuidados que se deben tener para su construcción.

La construcción de una biblioteca de ADNc involucra varias etapas que incluyen el aislamiento del ARN poli(A)<sup>+</sup>, la síntesis del ADNc de cadena simple y luego la conversión en cadena doble, el agregado de *linkers* o adaptadores para el clonado en vectores apropiados, el ligado al vector y en el caso de ser una biblioteca hecha en un bacteriófago, la encapsidación y la infección.

La producción de una biblioteca representativa comienza con el aislamiento del ARN intacto, utilizando metodologías que inhiban efectivamente las RNAsas durante la extracción. Los procedimientos que usan el tiocianato de guanidina son los más practicados, aunque es crítico para la integridad del ARN, el tiempo que transcurre desde la remoción del órgano y su tratamiento en la solución inhibidora. Como el ARNm comprende menos del 5% del ARN total, es ventajoso enriquecer el ARNm poli(A)<sup>+</sup> por una o dos rondas de cromatografía en celulosa-oligo(dT) (Jacobson, 1987) y la calidad de los ARNs poli(A)<sup>+</sup> debe ser controlada por Northern blot. Existen algunas opciones en la construcción de bibliotecas de ADNc y diferentes laboratorios tienen preferencias propias respecto a la elección del iniciador para construir el ADNc de cadena simple [oligo(dT), pequeños iniciadores al azar o iniciadores con el agregado de secuencias de restricción]. También hay preferencias respecto a la retro-transcriptasa [AMV, MMLV o la más reciente SuperScript II que es la misma MMLV pero corregida por ingeniería genética para eliminar su actividad RNasa H asociada y permitir además ser utilizada a temperaturas más altas (45°-50°C). Se sospecha que esto aumenta la probabilidad

de obtener ADNc completos (*full-length*) (Gerard *et al.*, 1992)]. La elección de la direccionalidad del clonado de los ADNc es de acuerdo al uso posterior que se haga de la biblioteca. Puede hacerse a través del agregado de secuencias con sitios específicos para enzimas de restricción (*linkers*) (Helfmaan *et al.*, 1987) o por el uso de un adaptador oligo(dT) unido a un sitio de restricción poco frecuente (Sall o NotI) (Bhagwat, 1992). Después de acoplar los *linkers* o adaptadores, el ADNc es ligado a un vector apropiado al uso posterior de la biblioteca. El bacteriófago  $\lambda$ gt11 es una buena opción para hacer un *screening* con anticuerpos, en cambio si los clones van a ser secuenciados o usados para la síntesis de sondas, la elección de un fagemido (pBluscript o pT7T3D) parece ser la mejor (Short *et al.*, 1992). Recientemente Stratagene introdujo un nuevo fagemido/bacteriófago llamado ZAP Express, el cual contiene las secuencias necesarias para su expresión en células eucariontes y procariontes.

Otra opción es la compra de un *kit* de síntesis que provee los reactivos ya probados y las instrucciones para la síntesis de más de una biblioteca. En nuestra opinión, es quizás la alternativa más rentable frente a la variedad de productos y opciones que se ofrecen.

Sin embargo, ya sea que uno construya su propia biblioteca, la pida o la compre, el evento de aislar genes expresados diferencialmente dependerá de la calidad y de la cantidad de clones que haya en la biblioteca (Hagen *et al.*, 1988). Esto afectará directamente la probabilidad de recuperar los ADNc completos y también de recuperar los ARNm pobremente expresados. Copias de un ARNm raro requerirá un *screening* en una biblioteca de entre  $10^5$  y  $10^6$  clones (no amplificados).

#### *screening diferencial*

El *screening* diferencial, también llamado búsqueda +/- (*plus/minus screening*) (Sargent, 1987), permite una comparación gen por gen entre las dos poblaciones

de ARNm a estudiar. Por ejemplo, los ARNm provenientes de un cáncer de colon y su mucosa normal adyacente, pueden ser comparados a través de la hibridación en paralelo de una biblioteca de ADNc, construida a partir de la población derivada del tumor, con sondas diseñadas a partir de cada una de las dos poblaciones de ARNm. La biblioteca de ADNc puede ser construida utilizando como vector un bacteriófago o un fagemido, de esta forma se analizarán placas de lisis producto de la transducción del fago vector o bacterias transformadas y se transferirán a membranas adecuadas (actualmente las membranas de *nylon* ofrecen las mejores ventajas en cuanto a capacidad y reutilización), cuidando que la cantidad de vector recombinante en las membranas a comparar no sea una fuente de variabilidad (Lemke *et al.*, 1993). El ADNc es fijado a la membrana y éstas, en general por duplicado, son hibridadas con sondas complejas hechas a partir de las poblaciones de ARNm que se van a comparar. Las sondas pueden prepararse de varias formas aunque la que parece proveer una actividad específica mayor, es la incorporación de un nucleótido marcado [<sup>32</sup>P]-dNTP (comunmente la opción más usada es [<sup>32</sup>P]-dCTP) durante la síntesis del ADNc de cadena simple (Ausubel *et al.*, 1988). Las sondas también pueden ser preparadas por transcripción *in vitro*, a partir de un vector adecuado, teniendo en cuenta que las secuencias de los dos vectores (sonda y biblioteca) no deben cruzar entre sí (Lu *et al.*, 1990). El aislamiento del poli(A)<sup>+</sup> no es necesario para las sondas provenientes de ADNc, si este fue iniciado con un oligo(dT), y la ventaja de las sondas transcriptas *in vitro* es importante cuando la cantidad de ARNm disponible no es abundante.

Cada uno de los filtros preparados a partir de la biblioteca de ADNc es hibridado con una de las poblaciones de ARNm a comparar. El hecho de encontrar variaciones en la incorporación de radioactividad de entre dos y cuatro veces para las sondas que se estudian, obliga a realizar controles internos de expresión. Esto

se hace estudiando genes constitutivos, reconocidos porque su concentración no varíe en las condiciones a comparar (*housekeeping genes*). Después de lavar los filtros en condiciones que aseguren eliminar la reacción cruzada, deben hacerse autoradiografías con exposiciones que varían entre 16 hrs y 2 semanas para detectar respectivamente genes relativamente abundantes de otros más escasos.

#### screening secundario

Una buena idea es confirmar el resultado obtenido con el clon aislado que corresponde a la secuencia expresada diferencialmente. En la práctica, los filtros preparados a partir de clones aislados en un primer *screening* muestran resultados espúreos cuando son hibridados con sondas limitantes. Un enfoque diferente puede solucionar el problema valiéndose de una amplificación del ADNc por PCR, migrando luego por duplicado en gel de agarosa e hibridando cada una de las bandas contra las sondas correspondientes a cada población. De esta forma, si el clon elegido en realidad está formado por más de uno, aquel expresado diferencialmente puede ser recuperado del gel de acuerdo a su tamaño (Luo *et al.*, 1994). También deben usarse controles de expresión durante el *screening* secundario sea cual fuere la estrategia elegida. Finalmente, en la práctica el sistema más fiable para demostrar la expresión diferencial de un clon es el Northern *blot*, en el que migrando sobre un gel la población original de ARN total o ARNm e hibridándola, luego de transferirla sobre una membrana, con una sonda preparada a partir del ADNc del clon expresado diferencialmente, se consigue una señal representativa de su expresión en el tejido de origen. Otras técnicas pueden ser utilizadas, por ejemplo, la protección-S1 o RT-PCR, sin embargo el Northern *blot* es usado como control en el 90% de los trabajos que reportan alguna de las técnicas aquí contempladas en la selección de clones expresados diferencialmente.

El *screening* diferencial sobre una biblioteca de ADNc fue utilizado para aislar ARNm específicos del ciclo celular (Lu *et al.*, 1990), genes inducidos por TNF en fibroblastos (Lee *et al.*, 1990), un gen inducido por estrés en macrófagos peritoneales de ratón (Ishii *et al.*, 1993) y genes afectados por una infección de SV40 en células de riñón de ratón (Khandjian *et al.*, 1992), entre otros.

Se describieron variaciones sobre el *screening* diferencial. Por ejemplo, algunas bibliotecas de ADNc fueron hibridadas con sondas marcadas que lo habían sido previamente, con un exceso del ARNm no marcado de la otra población a estudiar (*Differential Competition Hybridization*). Esta técnica fue utilizada con éxito para clonar genes regulados durante el desarrollo en *Dictyostelium* (Mangiarotti *et al.*, 1981) y proteasas serina-específica de linfocitos T-citotóxicos (Gershenfeld *et al.*, 1986).

#### ***Substracted cDNA libraries* (clonado por sustracción en bibliotecas de ADNc)**

La sustracción se usa para construir bibliotecas enriquecidas en secuencias expresadas preferencialmente. Para aislar clones que representan genes expresados diferencialmente en un tipo celular, el ADNc de cadena simple es sintetizado a partir del ARNm de esas células y luego, hibridado con un exceso de ARNm (llamado "conductor" de la reacción) del otro tipo celular. Las secuencias comunes en los tipos celulares estudiados formarán híbridos que podrán ser removidos por una variedad de técnicas, mientras que el ADNc de cadena simple (sustraído) podrá ser recuperado y clonado (Sargent, 1987). La técnica más clásica para eliminar los híbridos es a través de una columna de hidroxiapatita. Ésta, permite la separación de ácidos nucleicos de cadena simple de los de cadena doble, reteniendo estos últimos a baja concentración salina. Sin embargo, se hizo más popular el marcar los ARNm conductores con biotina, proceder a la hibridación



con el ADNc y unir específicamente streptavidina para remover el complejo híbrido-proteína por una extracción fenol-cloroformo, dejando en solución acuosa los ADNc de cadena simple sustraídos (Sive *et al.*, 1988; Rubenstein *et al.*, 1990). Estos ADNc son recuperados, convertidos en ADNc de cadena doble y clonados. Una variación de este método de sustracción usa fagemidos como vectores para producir ADNc de cadena simple de las dos poblaciones que van a ser sustraídas. Las bibliotecas de ADNc son direccionalmente clonadas en los fagemidos, con los insertos de una población en dirección opuesta a los de la otra. Los ADNc de cadena simple son producidos por cada población resultando complementarios. El ADNc de una población es hibridado con un exceso de la cadena complementaria marcada con biotina y los híbridos son eliminados por una columna de afinidad avidina-biotina o por una extracción streptavidina-ferol (Duguid *et al.*, 1988; Rubenstein *et al.*, 1990). Otra modificación consiste en hibridar insertos provenientes de fagemidos, con ARNm poli(A)<sup>+</sup> conductores o ARN *sense* de la otra biblioteca (Rothstein *et al.*, 1993).

Un ADNc sustraído (por alguno de los métodos descritos) puede ser marcado y usado para hibridar la biblioteca original (Swalla *et al.*, 1993; Satoh *et al.*, 1994; Welsh *et al.*, 1994), o en algunos casos una biblioteca ya sustraída (Reynet *et al.*, 1993). Una modificación adicional, consiste en el uso de un agente que produzca una reacción cruzada para hacer una sonda sustraída (Hampson *et al.*, 1992). En este caso el ADNc de cadena simple es hibridado con un exceso de ARN poli(A)<sup>+</sup> para formar híbridos de cadena doble, los que son incubados con 2,5 diaziridinyl-1,4-benzoquinona que une covalentemente los pares de bases GC entre las cadenas híbridas. En este caso no es necesario separar los híbridos de cadena doble para sintetizar una sonda por *random priming*.

Los mayores problemas de la técnica de sustracción son la gran cantidad de ARN poli(A)<sup>+</sup> que se necesita para "conducir" la sustracción y la pequeña cantidad de ADNc que se recupera para el clonado. Esto dificulta su uso para clonar genes expresados a bajos niveles. Este problema tuvo solución con el uso de la amplificación por PCR, así pueden hacerse muchas rondas de sustracción a partir de una cantidad limitada de ARN de origen (Wang *et al.*, 1991a; Cecchini *et al.*, 1993). Un método que permite recuperar el conductor de la reacción consiste en preparar ADNc a partir de un oligo(dT)-biotinilado, el cual luego es conjugado con bolitas metálicas cubiertas con streptavidina. De esta forma, el ADNc (conductor) es hibridado al ARN poli(A)<sup>+</sup> en presencia de un oligo(dT) bloqueante y los híbridos son removidos con un imán o magneto dejando en solución los ARNm sustraídos. El ADNc puede ser reciclado para otra u otras sustracciones y finalmente el ARNm soluble es clonado (López-Fernández *et al.*, 1993). De una forma análoga, el ADNc conductor de la reacción puede sintetizarse a partir de un oligo(dT) unido covalentemente a una partícula de látex, removiendo después los híbridos por centrifugación (Hara *et al.*, 1991). Una variante es utilizar ADNc *sense* (producido por PCR asimétrica), en lugar de ARN, para hibridar contra la población de ADNc que conduce la reacción. Esto evita la degradación del ARN y aumenta el número de clones restados (Hara *et al.*, 1993).

Construcciones de bibliotecas sustraídas o variantes de este método fueron usadas para clonar por ejemplo, un nuevo miembro (*rad*) de la familia del *ras* (Reynet *et al.*, 1993), el receptor para el antígeno de las células T (Hedrick *et al.*, 1984), el receptor murino para la *Il-4* (Mosley *et al.*, 1989), la secuencia *MyoD* (Davis *et al.*, 1987) y el tumor supresor (*WAF1*), inducible por *p53* (el-Deiry *et al.*, 1993) entre muchos otros.

***Differential display (PCR con iniciadores arbitrarios)***

Esta técnica llamada *differential display* (Liang *et al.*, 1992a; Liang *et al.*, 1993) o *arbitrarily primed PCR* (Welsh *et al.*, 1992; Ralph *et al.*, 1993), permite la identificación rápida y el clonado de secuencias expresadas diferencialmente. El método se vale de la especificidad de la PCR y no requiere la construcción de bibliotecas de ADNc. Los genes expresados diferencialmente son identificados a partir de la síntesis de ADNc y de una posterior PCR con iniciadores cortos y arbitrarios. Los productos de PCR a partir de distintas poblaciones, son comparados en un gel de secuencia en dos líneas adyacentes. El ADN amplificado, es normalmente marcado con  $^{35}\text{S}$  para una mejor resolución sobre un gel de secuencia.

El número de transcritos que puede identificarse en un gel, depende de los iniciadores que se utilicen. Para maximizar el número de productos, un grupo de cuatro oligonucleótidos degenerados, puede diseñarse para el extremo 3': d(T)<sub>12</sub>(A, G, C)N (donde N reemplaza a A, C, G o T) y éstos deberían reconocer a todos los ARNm. Esta es una de las ventajas de la técnica, es decir que no hace falta partir de ARNm purificado (Liang *et al.*, 1993). Cada uno de esos iniciadores en 3' forma dupla, para la PCR, con una corta secuencia (10 nt) en el extremo 5', dando un número finito de bandas identificable en un gel de secuencia. Con aproximadamente 20 iniciadores en 5' (80 reacciones en total) uno podría examinar una cantidad significativa de ARNm de una población. Esos oligonucleótidos cortos deben tener un 50% de GC en su secuencia con una G o C en su extremo 3' para asegurar un apareamiento estable de bases (Bauer *et al.*, 1993). También una G o C en el extremo 5' podría ser importante (Mou *et al.*, 1994) y no deben contener apareamientos internos, esperándose que los iniciadores hibriden con algunos errores (*mismatching*) a la matriz. Es importante que, por lo menos, seis

nucleótidos estén bien apareados en el extremo 3' y puede haber tres o cuatro errores hacia el extremo 5' (Mou *et al.*, 1994).

En un estudio, realizado a partir de esta técnica, en el cual se intentó identificar nuevos genes reguladores, varios iniciadores fueron diseñados para poder hibridar con regiones que codifiquen cierres de leucina (*leucine zipper*), dedos de zinc (*zinc finger*) y dominios SH2. No obstante los genes encontrados fueron la fosfofructokinasa, la sintetasa de ácidos grasos y una Ca<sup>++</sup> retículo sarco(endo)plásmico ATPasa de tipo 2, debido a las débiles interacciones inespecíficas en su apareamiento (Hsu *et al.*, 1993). Este experimento ilustra uno de los principios de esta técnica: los iniciadores normalmente se aparean con considerable error pero esa interacción es suficientemente estable y reproducible para generar productos de PCR.

Un análisis de las secuencias expresadas diferencialmente, requiere el aislamiento del ADN (cortando la banda del gel), eluyéndola, reamplificándola y purificándola nuevamente en otro gel. El ADN así obtenido, puede ser usado en la construcción de sondas para Northern *blot* (como control) o puede ser directamente clonado utilizando algún *kit* específicamente diseñado, para subclonar productos de PCR (como los que comercializan Promega o Stratagene).

En la práctica se observa que las bandas reamplificadas son normalmente contaminadas con otros ADN y debido a esto, es aconsejada una segunda ronda de selección para el clon aislado. Esta, podría llevarse a cabo marcando radiactivamente (<sup>32</sup>P) la reacción inicial de PCR, usándose como sonda para hacer un *screening* en una biblioteca adecuada (Callard *et al.*, 1994) y, finalmente, la confirmación podría hacerse por Northern *blot*.

Una de las ventajas más grandes de la PCR a partir de iniciadores arbitrarios, es que fácilmente pueden compararse más de dos poblaciones de ARN, ya que varias

reacciones separadas pueden migrarse una al costado de la otra (Liang *et al.*, 1993). Además, los cambios en la expresión de genes producidos durante el transcurso de un proceso tumoral (que comprende varias etapas), podrían ser examinados en un mismo gel. De la misma forma, múltiples muestras de diferentes orígenes patológicos podrían mostrarse en un mismo gel para buscar un común denominador.

Esta técnica fue utilizada para identificar genes expresados diferencialmente en células de pulmón tratadas con el TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*) (Ralph *et al.*, 1993), en fibroblastos tratados con FGF-1 (*Fibroblast Growth Factor-1*) (Hsu *et al.*, 1993), en el cáncer de ovario (Mok *et al.*, 1994), durante el desarrollo del tumor mamario y en el cáncer de mama (Liang *et al.*, 1992b; Zhang *et al.*, 1993; Sager *et al.*, 1993), y en células musculares lisas de la aorta tratadas con glucosa (Nishio *et al.*, 1994), entre muchos otros genes.

Una búsqueda por Medline fue hecha desde 1989 a la fecha (Tabla III) y muestra la progresión de clonados por las tres técnicas discutidas entre 1989 y 1996.

|                                  | 1989 | 1996 |
|----------------------------------|------|------|
| <i>Screenig differential</i>     | 20   | 40   |
| <i>Subtracted cDNA libraries</i> | 1    | 2    |
| <i>Diferential display</i>       | 4    | 94   |

**Tabla III**

## ***OBJETIVOS***

Los genes cuya expresión en tumores es muy diferente de la que se observa en las células normales, constituyen potenciales marcadores del cáncer. Durante el cáncer ocurren modificaciones fenotípicas como el resultado de cambios cuantitativos y cualitativos de la expresión de ciertos genes. Sobre esta base, distintas estrategias de trabajo se han desarrollado a fin de identificar marcadores del cáncer colorectal. Ellos incluyen la utilización de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de superficie (Bresalier *et al.*, 1985), el clonado de ARNm por *screening* diferencial (Bartsch *et al.*, 1986; Yow *et al.*, 1988; Denis *et al.*, 1993) o por hibridación sustractiva (Kondoh *et al.*, 1992; Barnard *et al.*, 1992; Schweinfest *et al.*, 1993; Barnard *et al.*, 1993), o la identificación de proteínas de la matriz nuclear por electroforesis en doble dimensión de alta resolución (Keesee *et al.*, 1994). Lamentablemente, ninguno de ellos puso en evidencia marcadores adecuados del cáncer de colon. Nosotros proponemos el desarrollo de una estrategia alternativa. Esta, consiste en establecer el fenotipo de un cáncer colorectal a través de la caracterización (secuenciamiento parcial) al azar de un gran número de sus transcritos. Esta colección de ADNc debería representar la proporción real de cada uno de los ARNm en el tumor. Las estrategias que utilizan el secuenciamiento sistemático de una gran biblioteca de ADNc y su posterior tratamiento informático, comenzaron a principios de esta década y ya han sido utilizadas en otros sistemas con resultados prometedores (Adams *et al.*, 1991; Wilcox *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1993).

En nuestro laboratorio el Dr Frigerio construyó una biblioteca de ADNc con los ARNm purificados de un tumor colorectal y secuenció parcialmente 2166 clones. Luego se estudió la frecuencia de cada clon, para inferir su expresión real en la biblioteca. A través de la comparación de secuencias con diversas bases de datos, se pudo establecer que 1014 secuencias correspondieron a genes ya clonados en humanos o a secuencias homólogas de otras especies, 142 correspondieron a

secuencias EST (*Expressed Sequence Tag*) ya identificadas, 119 a secuencias repetitivas, ARNr 28S o a secuencias poli(A) solamente. Sorpresivamente 891 correspondieron a transcritos desconocidos que representaban el producto de 740 nuevos genes (Frigerio *et al.*, 1995).

En una primera etapa, nuestra estrategia consiste en depositar una gran cantidad de clones únicos (no repetidos) sobre una membrana de *nylon*, gracias a la ayuda de un sistema robotizado. Luego se comparará la expresión de cada clon (previamente identificado) en el tumor y el tejido sano adyacente.

El tratamiento simultáneo de una gran cantidad de clones (1536 por membrana), su reproductibilidad y su sensibilidad, hacen de esta técnica una herramienta sumamente efectiva para todo tipo de estudio sistemático.



***MATERIALES y METODOS***

## ***Screening* diferencial sobre membranas con clones depositados a alta densidad**

### **Recolección de tejidos**

Las muestras de tejido utilizadas para confeccionar el *screening* de clones expresados diferencialmente sobre membranas a alta densidad, fueron obtenidas del Service de Chirurgie Digestive, Hôpital Sainte Marguerite (Marseille, France). Todos los riesgos biológicos relativos a los experimentos que se describen, fueron examinados previamente por el Comité de Control Nacional Francés.

### **Preparación de membranas con alta densidad de colonias**

Las colonias (seleccionadas de la biblioteca del Dr Frigerio) fueron crecidas en 16 placas (96 Multiple well, Cell Wells, BIBBY) y luego depositadas sobre una membrana Hybond-N (Amersham, Les Ulis, France) usando una estación robótica BIOMEK 1000 (Beckman, San Ramon, CA) con un cabezal de 96 puntas que ajusta precisamente a una placa de 96 pocillos (Cell Wells, BIBBY), en una disposición ordenada como lo describió Nguyen *et al.* (1995). Las membranas fueron tratadas como lo describió Nizetic *et al.* (1991) con la siguiente modificación: el tratamiento con proteinasa-K (250 µg/ml) fue hecho durante 2 hrs. a 37°C para lograr una más eficiente remoción de proteínas y así disminuir el ruido de fondo y aumentar la intensidad de cada señal.

### **Preparación y marcado de sondas complejas**

El ARN total fue aislado por el método de tiocianato de guanidina (Chirgwin *et al.*, 1979) de 5 adenocarcinomas de colon y de la mucosa normal adyacente. El ARN poliadenilado fue purificado por un Magnetic Bead System [biotin-oligo(dT) and

avidin-conjugated beads] (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Un  $\mu\text{g}$  de ARN poli(A)<sup>+</sup> fue calentado a 65°C y luego enfriado en hielo para deshacer las estructuras secundarias. Las sondas complejas fueron preparadas por una transcripción-reversa del ARN poli(A)<sup>+</sup> desnaturalizado, en presencia de 100  $\mu\text{Ci}$  de [<sup>32</sup>P]dCTP usando pequeñas secuencias al azar de 6 nt como iniciadores.

### Condiciones de hibridación

Los filtros fueron pre-hibridados durante 4 hrs a 42°C en un tampón conteniendo 50% formamida deionizada, 4X SSC (1X SSC= 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio), 50 mM NaPi, 0.2% BSA, 0.2% Ficoll, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 2% SDS, 8% dextrán sulfato y 1 mM EDTA. La hibridación se realizó con la misma solución y a la misma temperatura pero durante 16 hrs y en presencia de la sonda sintetizada con el ARN poli(A)<sup>+</sup> de un carcinoma colorectal, preparada como se describió en la sección precedente. Los filtros se usaron en duplicado o en triplicado y después de la hibridación fueron lavados 1 vez a temperatura ambiente en 2X SSC, 0.1% SDS y luego sucesivamente en 0.5X SSC y 0.2X SSC, cada vez a 65°C durante 20 min. Las membranas fueron expuestas toda la noche a una película radiográfica o a un *Fuji Imaging Plate* (Tokyo, Japan). Las membranas fueron deshibridadas por incubación en 0.4 M NaOH a 45°C durante 30 min y luego transferidas a una solución conteniendo 0.1X SSC, 0.1% SDS, 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, durante 15 min. La deshibridación fue controlada por una exposición de las membranas por un período comparable al utilizado durante el ensayo. Los filtros fueron luego hibridados con la sonda sintetizada a partir del ARN poli(A)<sup>+</sup>, extraído de la mucosa normal correspondiente y re-expuestos en las mismas condiciones. Este protocolo fue aplicado sobre 5 pacientes distintos, a fin de seleccionar aquellos clones que se expresan diferencialmente en la mayoría de los tumores colorectales.

### **Cuantificación de las señales de hibridación**

Las autorradiografías sobre películas de rayos-X fueron utilizadas únicamente para el posicionamiento o para preparar las figuras de este trabajo. La cuantificación de los datos fue obtenida usando un *imaging plate device*. Los filtros hibridados, fueron expuestos a un *imaging plate* por 16 a 24 hrs y luego la señal fue digitalizada en un FUJIX BAS 1000 system (Fuji). Esos resultados representan la distribución de la radioactividad sobre los filtros, con una respuesta lineal por encima de 4 órdenes de magnitud. Las señales de hibridación fueron determinadas por una versión modificada del Biomage Software (Millipore, Bedford, MA) sobre una estación de trabajo Unix. La imagen correspondiente a cada filtro fue posicionada respecto a un control que contiene la señal de los 1536 clones depositados. Este paso asigna el nombre correcto a cada colonia y de esta forma es posible crear una tabla conteniendo los datos relativos a la intensidad y área de cada señal. El archivo así generado fue exportado a un programa tipo Excel para el posterior análisis de los datos.

### **Clonado parcial de distintos ADNc**

Procediendo de esta forma, 234 clones desconocidos fueron detectados y mostraron estar expresados diferencialmente durante el desarrollo del cáncer colorectal, con la sonda compleja proveniente del primer paciente. Una proporción similar de clones expresados diferencialmente se encontró con los 4 pacientes restantes. Sin embargo, sólo 23 clones fueron constantemente sub-expresados y 51 sobre-expresados en los 5 tumores analizados. La secuencia parcial de los 74 insertos fue completada y recomparada contra GenBank.

### **Secuenciamiento**

Los ADNc insertados en el fagemido pT7T3D fueron secuenciados con un Sequenase Versión 2.0 DNA Sequencing kit (United States Biochemical) usando el iniciador univeral -40 provisto en el *kit* y luego con iniciadores específicos oportunamente sintetizados por Eurogentec (Bélgica). Las reacciones de secuencia fueron migradas en un gel de acrylamida 6% con 7.5 M de urea, fijados y secados según se describe en el protocolo del Sequenase Versión 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical). Las autoradiografías fueron obtenidas después de exposiciones de 16 hrs. y leídas en un IBI Reader Gel system (IBI, New Haven) usando el IBI MacVector Sequence Analysis software (IBI, New Haven).

### **Análisis de la base de datos**

Cada secuencia fue comparada contra todas las disponibles en GenBank (Re. 83.0) usando el BLAST (*network service program manual* para el Wisconsin Package, Versión 8, Septiembre 1994, Genétics Computer Group, 575 Science Drive, Madison Wisconsin, USA 53711) (Altschul *et al.*, 1990). La base de datos utilizada fue GenBank-*all* y solamente fueron mostradas las 10 mejores similitudes, desde la más significativa estadísticamente (el valor-P Poisson más bajo) hasta la menos significativa estadísticamente (el valor-P Poisson más alto) (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias fueron consideradas como homólogas (no humanas) cuando el valor-P fue más bajo que  $10^{-10}$  (identidad > 60%).

## Clonado y estudio de la expresión de la galectina-4 humana

### Clonado y secuencia del ADNc de la galectina-4 humana

El clon 6C2 fue seleccionado a través del *screening* con membranas a alta densidad descrito anteriormente. La secuencia completa de ese inserto mostró ser la contraparte humana de la galectina-4 de mamíferos (Oda *et al.*, 1993; Chiu *et al.*, 1994). El inserto 6C2 contenía la secuencia desde la posición 91 a 1110 respecto de la secuencia completa. Para clonar el extremo 5' del ARNm, nosotros desarrollamos una estrategia basada en la RT-PCR. Un oligonucleótido específico de la región 3' (5'-GGGTAAGGTGGCATCATCGG-3'), derivado de la secuencia del clon 6C2 en la posición 485-466 fue combinado con una secuencia adaptadora (5'-GGGAATTC-3') conteniendo un sitio de restricción EcoRI (subrayado). El oligonucleótido correspondiente al extremo 5' faltante, fue diseñado sobre la secuencia del ARNm de la galectina-4 de cerdo (nucleótidos 15 a 35), previamente publicada (Chiu *et al.*, 1994) y fue combinada con la misma secuencia adaptadora conteniendo el sitio de restricción EcoRI. La primera cadena del ADNc (RT) fue sintetizada incubando 1 µg de ARN total de mucosa normal de colon con un iniciador oligo(dT), el SuperScriptT Preamplification System (Gibco BRL, Sweden) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de amplificación se hizo en un PCR-buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatina) al que se le agregaron sucesivamente 125 µM dNTP, 25 pmol de cada oligonucleótido, 2 µl del producto de la RT y 2,5 unidades de Taq polymerase Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) en un volumen final de 50 µl, usando el protocolo Touchdown descrito en por Don *et al.* (1991). El producto de la PCR, mostró el tamaño esperado (aprox 550 nt) y fue digerido con

EcoRI, electroeluido, extraído con fenol/cloroformo y precipitado con etanol. El ADN así obtenido fue ligado en un vector pBluescript KS<sup>+</sup>, previamente digerido con EcoRI, y el producto de la ligación se utilizó para transformar *E. coli* JM109. Los clones recombinantes fueron seleccionados, se preparó ADN de cadena simple y se secuenció en ambos sentidos usando Sequenase versión 2.0 DNA Sequencing Kit (U.S. Biochemical Corp.) y oligonucleótidos apropiados. Todas las manipulaciones concernientes al clonado (restricciones, ligaciones, transformaciones, *blotting* y purificaciones) se realizaron según Sambrook *et al.* (1989).

### **Recolección de tejidos, Northern y *dot blot***

Las muestras de tejido utilizados en este estudio fueron obtenidas de la Cattedra di Chirurgia de la Universita di Palermo (Italia), de acuerdo a las normas institucionales y procedimientos vigentes (CEE). Los colocalcinomas humanos fueron clasificados de acuerdo a la WHO (World Health Organization) en: Dukes A (n=3), Dukes B (n=5), Dukes C (n=7) y Dukes D (n=4). Las líneas celulares de colon humano (LS174T, PF11, TC7, SW480 y HT29) fueron cultivadas como fue descrito previamente (Chantret *et al.*, 1988). El ARN total de la mucosa normal y de los tumores se extrajo con tiocianato de guanidina según Chirgwin *et al.* (1979), y el ARN de las líneas celulares usando tiocianato ácido de guanidina según Chomczynski *et al.* (1987). Para los Northern *blot*, 20 µg de ARN desnaturalizado de cada muestra fueron migrados en un gel (1% agarosa-formaldehido) y transferido a una membrana de *nylon* (Gene Screen, Dupont). Para el *dot blot*, 5 µg de ARN desnaturalizado de cada muestra fueron depositados sobre una membrana de *nylon* como se describió previamente (Sambrook *et al.*, 1989). El filtro fue fijado por 2 hrs a 80°C y prehibridados por 4 hrs a 42°C en un tampon conteniendo 50%

de formamida deionizada, 5X SSPE (1X SSPE= 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5), 0.1% BSA, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.8% SDS, 8% dextrán sulfato y 200 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de arenque. La hibridación se realizó en la misma solución, a la misma temperatura y en presencia del ADNc del inserto 6C2 marcado con <sup>32</sup>P (por *random priming*) como sonda. Los filtros fueron lavados 4 veces a temperatura ambiente en 2X SSPE, 0.1% SDS durante 5 min, dos veces a 65°C en 0.1X SSPE, 0.1% SDS durante 15 min y una vez en 0.1X SSPE por 30 min. Las membranas fueron expuestas a un Hyperfilm (Amersham, UK) durante 24 hs a -80°C. La cuantificación del ARN depositado en el Northern *blot* fue controlada estimando el ARNr 28S. La concentración de ARN utilizada en el *dot blot* y su integridad, fueron controladas por coloración con bromuro de etidio en geles de agarosa (1%).

### **Estudio de la expresión de la PAP y de las PSP I y II**

#### **Recolección de tejidos, Northern y dot blot**

Las muestras de tejido utilizadas en este estudio fueron obtenidas igualmente de la Cattedra di Chirurgia de la Universita di Palermo (Italia), de acuerdo a las normas institucionales y procedimientos vigentes (CEE). Los colocalomas humanos fueron clasificados de acuerdo a la WHO (World Health Organization) en: Dukes A (n=3), Dukes B (n=5), Dukes C (n=5) y Dukes D (n=4). El ARN total, los Northern *blot* y las hibridaciones se llevaron a cabo de forma similar a la descrita para el estudio de la galectina-4. Las hibridaciones se realizaron en presencia de sondas hechas a partir de los clones 19A6 (PAP I), 5B8 (PSP I) y 31A5 (PSP II), provenientes de la biblioteca del Dr. Frigerio (Frigerio *et al.*, 1995), marcadas con



<sup>32</sup>P (por *random priming*). Los filtros fueron tratados como se describió para la galectina-4 y expuestos aproximadamente durante un día. La integridad de todas las preparaciones de ARN, fue rutinariamente controlada por coloración con azul de metileno (Sambrook *et al.*, 1989) y la cuantificación del ARN depositado fue controlada estimando la cantidad relativa del ARNr 28S.

### **Western blot**

Las proteínas totales presentes en los sobrenadantes de los homogenatos fueron separadas por una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas fueron transferidas sobre membranas de nitrocelulosa utilizando la técnica descrita por Kyshe-Andersen (1984). La PAP I y PSP I fueron detectadas con antisueros contra la PAP I y contra la PSP I (dilución 1/1000 en ambos casos), reveladas con anticuerpos marcados con peroxidasa y dirigidos contra el fragmento Fc de inmunoglobulinas de conejo (800 ng/ml) (Immunotech, France).

### **Inmunohistoquímica**

Los trabajos que permitieron la localización inmunohistoquímica de la PAP I humana y la PSP I, fueron realizados gracias a la colaboración del Dr. Montalto (Cattedra di Medicina Interna de la Università di Palermo (Palermo, Italia). La técnica utilizada en esta ocasión fue brevemente la siguiente: los fragmentos de colon fueron sumergidos en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0.1 M pH 7.4) a 4°C durante una noche. Luego de varios lavados en PBS, las muestras fueron deshidratadas con alcohol y luego incluidas en parafina. Secciones de 5 µm fueron colectadas sobre portaobjetos y desparafinadas. Los sueros anti-PAP I y anti-PSP I fueron aplicados sobre las secciones de tejido durante 1 hr a una dilución de 1:800 en PBS que contenía 3% Tritón X-100 y 5%

BSA. Los cortes fueron lavados 3 veces durante 10 min en PBS, luego incubados con inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa y diluidas 1:100 en PBS que contenía 3% de Tritón X-100. Los cortes fueron lavados varias veces entre cada incubación y finalmente revelados con DAB (di-amino bencidina). Ninguna coloración fue observada en las reacciones de control, en las cuales el antisuero fue omitido, o cuando se utilizó antisuero no inmune de conejo.

## Clonado y estudio de la expresión del Cdx1 y Cdx2

### Clonado y secuencia de los ADNc Cdx1 y Cdx2

Los clones 6G2 y 32D6 fueron igualmente seleccionados durante el *screening* diferencial sobre membranas con alta densidad de clones. La secuencia completa de estos insertos evidenció que ellos son la contraparte humana de los extremos 3' del Cdx1 y Cdx2 murinos, respectivamente. El inserto 6G2 mostró 646 nt (desde la posición 1065 a 1711 en la secuencia completa del Cdx1), mientras que el 32D6 mostró 744 nt (1007 a 1751 respecto a la del Cdx2). Para completar la secuencia de ambos clones, nosotros hicimos un *screening* entre  $5 \cdot 10^5$  clones de una biblioteca de ADNc construida en el vector  $\lambda$ gt11 a partir de ARN de un colon normal estirpado de la zona contigua a un tumor (Clontech, Palo Alto, CA). Aproximadamente  $1,5 \cdot 10^4$  UFP de cada caja fueron transferidas a membranas de *nylon* (Hybond-N, Amersham) e hibridadas con sondas preparadas a partir de los insertos 6G2 y 32D6 marcados con  $^{32}\text{P}$  (por *random priming*). Las membranas fueron lavadas en condiciones de alta astringencia (4 veces por 30 min en 0,1% SSC y 0,2% SDS a 65°C) y autorradiografiadas entre 8 y 16 h. Un solo clon fue

detectado con la sonda del inserto 32D6 ( $\lambda$ Cdx2a) y aislado por una segunda ronda de rastreo. Su tamaño fue determinado en gel de agarosa 1,5% luego de ser amplificado en un PCR-buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatina) al que le agregaron sucesivamente 125  $\mu$ M dNTP, 25 pmol de oligos específicos del vector (por fuera de la secuencia insertada), 10  $\mu$ l de una dilución de la playa de lisis positiva (preparada en 100  $\mu$ l de una solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) y 2,5 unidades de Taq polymerase Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) en un volumen final de 50  $\mu$ l, usando el protocolo Touchdown descrito por Don *et al.* (1991). Después de ser digerido con la enzima EcoRI, el inserto amplificado fue purificado por electroelución, subclonado en el vector pBluescript KS<sup>+</sup> y transformado en *E. coli* JM109 competentes. Se seleccionaron los clones recombinantes. Estos fagos recombinantes, bajo la forma de cadena simple, fueron secuenciados en ambas direcciones con el Sequenase versión 2.0 DNA Sequencing Kit. (U.S. Biochemical Corp.) según las instrucciones del fabricante y con el iniciador universal -40 provisto en el *kit*. La secuencia se continuó con oligonucleótidos específicos. El clon  $\lambda$ Cdx2a contenía la secuencia correspondiente a la posición 624 a 1110 nt del ARNm del Cdx2. Cuando la sonda del clon  $\lambda$ Cdx2a fue usada para buscar en la biblioteca, 2 clones fueron aislados (entre  $5 \cdot 10^5$  fagos) y resultaron ser idénticos al  $\lambda$ Cdx2a. Para clonar los extremos 5' del ARNm de los dos Cdxs, desarrollamos una estrategia basada en la RT-PCR. Un oligonucleótido específico de la región 3'

(5'-GGGCTTGAGATGCCACGGGAG-3')

derivado de la secuencia del clon 6G2 para el Cdx1 y otro, también en 3'

(5'-TTTCCTCTCCTTTGCTCTGCGG-3')

derivado del  $\lambda$ Cdx2a para el Cdx2, fueron combinados con una secuencia adaptadora (5'-GGGAATTC-3') conteniendo un sitio de restricción EcoRI (subrayado). Los iniciadores correspondientes a los extremos 5' faltantes, fueron diseñados sobre la secuencia del ARNm murino previamente publicada (Duprey *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1993) para el Cdx1 y la correspondiente al ARNm murino (James *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994) y al ARNm de hámster (German *et al.*, 1992) para los Cdx2 y Cdx3 respectivamente. En el extremo 5', el Cdx1 fue específicamente amplificado con el iniciador

5'-AGGTGAGCAGTCGCTGGTCGTC-3' y el Cdx2 con

5'-GCGCC(C/T)CTGGCAGCCT(C/T)CA(A/G)CG-3'.

Ambos iniciadores fueron combinados con la misma secuencia adaptadora conteniendo un sitio de restricción EcoRI. Un  $\mu$ g de ARN total de mucosa normal de colon purificado por el método del tiocianato de guanidina (Chirgwin *et al.*, 1979), fue retro-transcripto con un oligo(dT) usando un cDNA Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción fue inactivada por calor (70°C durante 10 min) y luego extraída con fenol/cloroformo. El ADNc así preparado fue amplificado por PCR utilizando como matriz 2  $\mu$ l del producto de la RT, 4% DMSO y 2,5 unidades de Taq polymerase Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) en un volumen final de 50  $\mu$ l, usando igualmente el protocolo Touchdown descrito por Don *et al.* (1991). Los productos de la PCR, mostraron el tamaño esperado y fueron digeridos con EcoRI, electro-eluidos, extraídos con fenol/cloroformo y precipitados con etanol. El ADN obtenido fue ligado en un vector pBluescript KS<sup>+</sup>, digerido previamente con EcoRI, y así se transformó *E. coli* JM109 competentes. Los clones recombinantes fueron seleccionados, y secuenciados como ya se describió. Todas las manipulaciones concernientes al clonado (restricciones,

ligaciones, transformaciones, *blotting* y purificaciones) se realizaron según Sambrook *et al.* (1989).

### **Obtención de tejidos y Northern blot**

El tejido normal de colon y los adenocarcinomas colorectales utilizados en este estudio fueron obtenidos del Service de Chirurgie Digestive, Hôpital Sainte Marguerite (Marseille, France), de acuerdo a las normas institucionales y procedimientos vigentes (CEE). Los colocalcinomas humanos fueron clasificados de acuerdo a la WHO (World Health Organization) en: Dukes A (pacientes 4, 6, 7 y 12), Dukes B (pacientes 5 y 8), Dukes C (pacientes 9, 10 y 11) y Dukes D (pacientes 1, 2 y 3). Las líneas celulares de colon humano (LS174T, PF11, TC7, SW480 y HT29) fueron cultivadas como fue descrito previamente (Chantret *et al.*, 1988). El ARN total, los Northern *blot* y las hibridaciones se llevaron a cabo de forma similar a la descrita para la galectina-4. Las hibridaciones se realizaron en presencia de sondas hechas a partir de los clones 6G2 (Cdx1) y 32D6 (Cdx2), provenientes de la biblioteca del Dr Frigerio (Frigerio *et al.*, 1995), marcadas con <sup>32</sup>P (por *random priming*). Los filtros fueron tratados como se describió para la galectina-4 y expuestos durante tres días en todos los casos. La integridad de todas las preparaciones de ARN fue rutinariamente controlada por coloración con azul de metileno (Sambrook *et al.*, 1989) y la cuantificación del ARN depositado fue controlada con bromuro de etidio.

## Estudio de la función del Cdx1 y Cdx2 en el cáncer de colon

### Expresión endógena del Cdx1 y Cdx2 en células HT29

Las células de colon humanas HT29, fueron elegidas para realizar los experimentos *in vitro* por expresar muy bajos niveles de los transcritos correspondientes a los Cdx1 y Cdx2 (sólo detectables por RT-PCR o por Northern *blot*, después de 10 días de exposición. Para verificar la expresión endógena de los dos ARNm en HT29, nosotros recurrimos a una estrategia basada en la RT-PCR. Un  $\mu\text{g}$  de ARN total de células HT29, purificado por el método del tiocianato de guanidina (Chirgwin *et al.*, 1979), fue retro-transcripto con un oligo(dT) usando un cDNA Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción fue inactivada por calor (70°C durante 10 min.). El ADNc así preparado fue amplificado por PCR utilizando como matriz 2  $\mu\text{l}$  del producto de la RT, 4% DMSO y 2,5 unidades de Taq polymerase (Promega) en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . El Cdx1 fue amplificado a partir de los iniciadores específicos:

5'-GGGAATTCAGGTGAGCAGTCGCTGGTCGTC-3' y

5'-GGGAATTCACAGGAGCCCACTCCCAGCACC-3',

esperando un producto de 942 pb de acuerdo a la secuencia humana descripta para este ARNm (del nucleótido 1 al 942). El Cdx2 fue amplificado con los siguientes oligonucleótidos:

5'-GGGAATTCAGGCAGCATGGTGAGGTCTG-3' y

5'-GGGAATTCCTGAGGAGTCTAGCAGAGTCC-3'

y se esperaba un producto de 1048 pb según la secuencia humana (desde el nucleótido 32 al 1080). Las amplificaciones fueron realizadas usando el protocolo Touchdown descripto por Don *et al.* (1991).

### **Inducción por ácido retinoico**

El ensayo se realizó en células HT29 cultivadas durante 4 ó 16 días (incluyendo el período de inducción por el RA). La inducción se realizó durante 24 ó 48 hrs. en presencia de diferentes concentraciones de RA ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M).

### **Cultivo celular**

La línea celular de carcinoma humano HT29 fue obtenida del Dr. Zweibaum (INSERM U.178, Paris, France). De rutina las células fueron crecidas en un incubador a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire atmosférico, en medio Dulbecco's modified Eagle's con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco), 4 mM L-glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Invariablemente las células fueron despegadas y disociadas con 0.05% de tripsina y 0.02% EDTA cuando alcanzaban un 80-90% de confluencia y replaqueadas, en cantidad adecuada, sobre una nueva caja de Petri.

### **Construcción de líneas celulares estables**

Todos los insertos fueron generados por RT-PCR usando ARNm de colon normal como molde de amplificación. Los iniciadores fueron elegidos de las secuencias ADNc de los Cdx1 y Cdx2 (Mallo *et al.*, 1997). El Cdx1 fue amplificado con los iniciadores específicos:

5'-GGGAATTCAGGTGAGCAGTCGCTGGTCGTC-3' y

5'-GGGAATTCACAGGAGCCCACTCCCAGCACC-3',

y se esperaba un producto de amplificación de 942 pb según la secuencia humana (desde el nucleótido 1 al 942). El Cdx2 fue amplificado con los siguientes oligonucleótidos:

5'-GGGAATTCAGGCAGCATGGTGAGGTCTG-3' y

5'-GGGAATTCCTGAGGAGTCTAGCAGAGTCC-3',

y se esperaba un producto de 1048 pb según la secuencia humana (desde el nucleótido 32 al 1080). Ambas secuencias fueron amplificadas con iniciadores que incluían un sitio de restricción EcoRI (subrayado). Los productos obtenidos fueron digeridos con EcoRI y subclonados en el mismo sitio en el vector de expresión para células mamíferas pcDNA3 (Invitrogen), en el extremo 3' del promotor CMV. El plásmido contiene además el gen para la aminoglucósido fosfotransferasa 3' que le otorga resistencia al antibiótico geneticina (G418-sulfato). De esta forma obtuvimos los vectores para el Cdx1 (pcDNA3Cdx1S), Cdx2 (pcDNA3Cdx2S) y sus correspondientes anti-senses (pcDNA3Cdx1AS y pcDNA3Cdx2AS). Todas las secuencias fueron verificadas por el método de terminación de cadena, usando el T7 Sequencing Kit (Pharmacia). Como control usamos el plásmido pcDNA3CAT en el que el gen CAT también se encuentra bajo el promotor del CMV. El inserto del pcDNA3Cdx2AS fue recuperado usando los sitios de restricción XhoI y BamHI, y direccionalmente subclonados en el vector pCEP4 (Invitrogen). De esta manera se logra la construcción del pCEP4Cdx2S, en el cual la expresión del Cdx2 está bajo el control del promotor del CMV, pero este vector otorga resistencia a la Hygromicina. Esta construcción fue confirmada por restricción con varias endonucleasas. Todos los plásmidos se purificaron con el Quiagen Plasmid Kit (Diagen, Hilden, Alemania) y las concentraciones de ADN fueron cuantificadas por espectrofotometría.

Los plásmidos pcDNA3Cdx1S, pcDNA3Cdx2S, pcDNA3Cdx1AS, pcDNA3Cdx2AS y pcDNA3CAT fueron transfectados establemente en células HT29 usando liposomas (lipofectina) (Felgner *et al.*, 1987) como es aconsejado por Gibco BRL. Para seleccionar células con una expresión estable, las células fueron cultivadas por 3 ó 4 semanas en un medio con 600 µg/ml de geneticina comenzando 48 hrs.



después de la transfección. Los clones sobrevivientes fueron mezclados y mantenidos en medio de cultivo suplementado con 400 µg/ml de geneticina. Para obtener las células que sobre-expresan ambos Cdx1 y Cdx2, las células HT29 transfectadas con el pcDNA3Cdx1S, fueron transfectadas nuevamente con el pCEP4Cdx2S y seleccionadas con una mezcla de 400 µg/ml de geneticina y 300 µg/ml de hygromicina. Los clones sobrevivientes fueron mezclados y mantenidos en medio de cultivo suplementado con 400 µg/ml de geneticina y 300 µg/ml de hygromicina.

Los plásmidos pcDNA3Cdx1S y pcDNA3CAT fueron también transfectados establemente en células IEC-6 usando liposomas (lipofectina) (Felgner *et al.*, 1987) como es aconsejado por Gibco BRL. Las células fueron seleccionadas con geneticina como se describió anteriormente para las células HT29.

**Expresión de Cdx1S, Cdx2S, Cdx1AS, Cdx2AS, Cdx-1S-2S y CAT en células HT29 transfectadas**

El ARN total purificado de células HT29 transfectadas, fue tratado con DNAsa libre de RNAsa y retro-transcripto con el SuperScript Preamplification System (Gibco BRL). Las transfecciones HT/Cdx1S, HT/Cdx2S, HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS fueron analizadas respectivamente por PCR con los siguientes iniciadores en 5':

5'-GGGAATTCAGGTGAGCAGTCGCTGGTCGTC-3',

5'-GGGAATTCAGGCAGCATGGTGAGGTCTG-3',

5'-GGGAATTCACAGGAGCCACACTCCCAGCACC-3' y

5'-GGGAATTCCTGAGGAGTCTAGCAGAGTCC-3'

y todos con el mismo oligo para la región 3' (correspondiente a la secuencia 3' no codante de la hormona de crecimiento bovina en el vector pcDNA3):

5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAGG-3'.

Los iniciadores, para verificar el extremo 5' de la construcción HT/Cdx-1S-2S, fueron los mismos que se usaron para las transfecciones HT/Cdx1S, HT/Cdx2S, pero el oligo correspondiente a la región 3' (específico de la secuencia 3' no codante del SV40 en el vector pCEP4) fue:

5'-CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'.

### **Ensayo CAT**

Para verificar la funcionalidad del vector en esta línea celular, se midió la actividad del gen reporter CAT de la línea HT/CAT. Una vez transfectadas las células HT/CAT fueron tratadas con 0,6 ml (para las cajas de 100 mm) de Reporter lisis Buffer (Promega) durante 15 min y cosechadas con una espátula plástica. Los lisados celulares se pasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron 10 min a 10000 g. Los sobrenadantes fueron incubados 10 min a 60°C (para inactivar las posibles desacetilasas endógenas) y recentrifugados como antes. En tubos eppendorf se agregó sucesivamente: 5 µl de cloranfenicol <sup>14</sup>C (0,025 mCi/ml), 5 µl de n-butilil Coenzima A (5 µg/ml), 30 µl del extracto de células transfectadas y Tris 0.25M pH 8,0 hasta un volumen final de 180 µl y se incubó a 37°C durante 1 hr. La reacción fue terminada con el agregado de 300 µl de xilol y agitada vigorosamente por 30 seg. Luego, se la centrifugó 5 min a 10000 g y se recuperó la fase orgánica. Se re-extrajo la fase orgánica 2 veces con Tris 0.25 M pH 8.0 en las mismas condiciones y, finalmente, 250 µl de la fase orgánica fueron contados en un contador de centelleo líquido en 10 ml de Instafluor (Hewlett Packard).

### **Estudios de proliferación celular *in vitro***

Las células HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS, HT/Cdx-1S-2S y HT/CAT o HT29 fueron crecidas en placas de cultivo con 12 pocillos conteniendo

5.10<sup>3</sup> células en cada uno, entre 1 y 6 días. El número de células fue estimado por un ensayo con MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;Thiazolyl blue) (Sigma) o contadas en un Hemacitómetro (Sigma). Las mediciones fueron hechas por duplicado y el experimento se repitió tres veces.

### **Estudios de proliferación celular *in vivo***

Con la finalidad de estudiar la proliferación de las células HT29 transfectadas *in vivo*, 5.10<sup>6</sup> células fueron resuspendidas en 200 µl de PBS e inoculadas por inyección sub-cutánea (detrás de los miembros anteriores), en ratones inmunodeprimidos NUDE (IFFA-CREDO, France) de 4 semanas de edad. Se inyectaron 5 ratones por cada tipo celular estudiado y los ratones fueron mantenidos, todo el tiempo que duró la medición, en una atmósfera estéril a 26°C constantes. El alimento, el agua y el colchon fueron esterilizados y cambiados cada 6 días. Diez días después de la inyección, los tumores son medidos (en dos dimensiones) cada tres días. El volumen es estimado por la fórmula,

$$V = (L \times l^2)/2$$

donde V=volumen, L=largo y l=ancho (Wang *et al.*, 1995). El promedio del volumen de los 5 tumores de cada tipo celular (HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S) es utilizado para construir la curva de crecimiento. Después de 30 días los animales son sacrificados y los tumores conservados para diferentes propósitos.

### **Análisis de la degradación del ADN**

#### *Detección de la fragmentación del ADN genómico*

Se analizó la fragmentación del ADN genómico como consecuencia de la muerte celular programada en las células (HT29) transfectadas. Aproximadamente 40.10<sup>6</sup>

células (por cada transfección estudiada) fueron recogidas en 500 µl de una solución cuya composición es: 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7 y 0.1% SDS. El contenido celular fue liberado por congelación-descongelación y tratado con RNAsa (libre de DNAsa) durante 2 hs a 37°C. El ADN fue extraído con fenol/cloroformo y precipitado con 2.5 vol de etanol. Un total de 10 µg del ADN así preparado, fue migrado en un gel de agarosa (1%) y teñido con bromuro de etidio.

### Por citometría de flujo o FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Para medir la resistencia a la apoptosis de las distintas células HT29 transfectadas,  $5 \cdot 10^5$  células fueron plaqueadas en cajas de Petri de 60 mm de diámetro y cultivadas en presencia de 10% SFB (Suero Fetal Bovino). Después de 48 hs las células fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo pero privadas de SFB. Cuatro días después, las distintas células fueron lavadas con PBS, despegadas y disociadas con 0,05% de tripsina y 0,02% EDTA y luego lavadas dos veces con PBS. Aproximadamente  $3 \cdot 10^5$  células por cada transfección, fueron permeabilizadas en presencia de 500 µl de yoduro de propidio, 0.005% de Nonidet P-40 y 10 µg/ml RNAsa. Después de una agitación vigorosa (vortex), las muestras fueron equilibradas durante una hora en la oscuridad antes de ser analizadas. El análisis de la fluorescencia del yoduro de propidio se realizó en un citómetro de flujo EPICS (Coulter Corporation).

### Por TUNEL

La resistencia a la apoptosis fue puesta en evidencia por la técnica de TUNEL usando un In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) sobre porta objetos conteniendo  $2 \cdot 10^4$  células de cada transfección. Las células fueron incubadas como se describió antes, es decir en presencia de 10% SFB durante 48 hs y luego privadas del mismo durante 96 hs. Las distintas células fueron fijadas en una solución al 4% de paraformaldehído en

PBS y se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente, el clivaje del ADN genómico producido durante la apoptosis genera fragmentos de bajo peso molecular que pueden ser identificados por el agregado de nucleótidos modificados en el extremo 3'-OH a través de una reacción enzimática. La TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) cataliza la polimerización de nucleótidos modificados (con moléculas de fluoresceína acopladas) a extremos 3'-OH libres del ADN. La fluoresceína incorporada es detectada por un anticuerpo específico que a su vez lleva acoplada una molécula POD (*peroxidasa*). En presencia de un sustrato adecuado, usualmente DAB (*di-amino bencidina*), la POD genera un producto insoluble que puede ser analizado por microscopía óptica.

### **Microscopía electrónica**

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron en colaboración con el grupo del Dr Jaques Marvaldi (URA CNRS-1924, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université Aix Marseille II, Faculté de Pharmacie). Brevemente, las células IEC-6 (de origen epitelio-intestinal de rata) transfectadas con el gen *reporter* CAT (IEC-6/CAT) y con la secuencia correspondiente al Cdx1 (IEC-6/Cdx1), fueron crecidas en una placa (plástica) para cultivo celular durante 30 días, lavadas con PBS, fijadas a temperatura ambiente en una solución 2.5% glutaraldehído-3.2% paraformaldehído tamponado con cacodylate 0.1M (pH 7.5), post-fijados en 2% tetraóxido de osmio en el mismo tampón, deshidratado y luego embebido en Epon. Secciones ultrafinas fueron cortadas en forma perpendicular al fondo de la placa y luego examinadas en un microscopio electrónico.

### **Análisis de la expresión del Ron por citometría de flujo**

El análisis de la expresión del Ron por citometría de flujo fue realizada, por inmunofluorescencia indirecta, sobre las células HT29 transfectadas. Las monocapas (de aprox 80% de confluencia) de las distintas células HT29 transfectadas, fueron lavadas con PBS, despegadas y dissociadas con 0.05% de tripsina y 0.02% EDTA. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  células de cada transfección, fueron incubadas con 5  $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal (clon ID-2) específicamente dirigido contra el Ron (provisto por el Dr. Montero-Julián, Immunotech, France) en 200  $\mu$ l durante 1 hr a 4°C. Después de 2 lavados con PBS, las células fueron incubadas por 30 min con un anticuerpo de cabra anti-ratón IgG conjugado con fluoresceína y vueltas a lavar con PBS para retirar el exceso del anticuerpo secundario. Más de  $5 \cdot 10^3$  células fueron analizadas usando un citómetro de flujo EPICS (Coulter Corporation). Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados altamente reproducibles. El ruido de fondo fue determinado por incubación de IgG como anticuerpo primario.

### **Estudio in vitro de la migración celular por la técnica de la "herida"**

Un estudio in vitro de la migración celular fue realizado en las diferentes células HT29 transfectadas. Para ello, aproximadamente  $3 \cdot 10^6$  células son depositadas en placas de 6 pocillos y son incubadas 3 días para permitir una monocapa confluyente. Una "herida" es practicada con un bisturí estéril según lo describió Bürk (1973) sobre la monocapa de células, cortando el tapiz de células y al mismo tiempo marcando el fondo del pocillo. El bisturí es desplazado lateralmente, despegando una parte del tapiz celular. El medio de cultivo junto con los restos celulares despegados son aspirados y remplazados por medio fresco sin suero, y con o sin

PMA 100 nM para estimular la migración. Para descartar la sobre-estimación debida a la división celular algunos pocillos son tratados con mitomicina (5 µg/ml) durante el experimento. Las placas son incubadas 24 hs a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y luego las células son fijadas en una solución de 2.5% formaldehído en PBS. La migración es cuantificada contando, en un total de 8 campos por pocillo, la cantidad de células que hayan pasado la línea establecida por el bisturí.

### **Análisis de la expresión de las integrinas $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\alpha 6$ , $\alpha v$ , $\beta 1$ y $\beta 4$ por citometría de flujo**

Sobre las células transfectadas se realizó el análisis de la expresión de las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 4$  por citometría de flujo, a través de una técnica de inmunofluorescencia indirecta. Monocapas (de aprox 80% de confluencia) de las distintas células HT29 transfectadas, fueron lavadas con PBS, despegadas y dissociadas con 0.05% de tripsina y 0.02% EDTA. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  células de cada transfección, fueron incubadas con 5 µg de anticuerpos policlonales monoespecíficos provistos por el Dr. Lizzitski (U.387 INSERM, Marseille, France) en 200 µl durante 1 hr a 4°C. Después de 2 lavados con PBS, las células fueron incubadas por 30 min con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína y vueltas a lavar con PBS para retirar el exceso del anticuerpo secundario. Más de  $5 \cdot 10^3$  células fueron analizadas usando un citómetro de flujo EPICS (Coulter Corporation). Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados reproducibles. El ruido de fondo fue determinado por incubación de IgG como anticuerpo primario.

## ***RESULTADOS y DISCUSION***



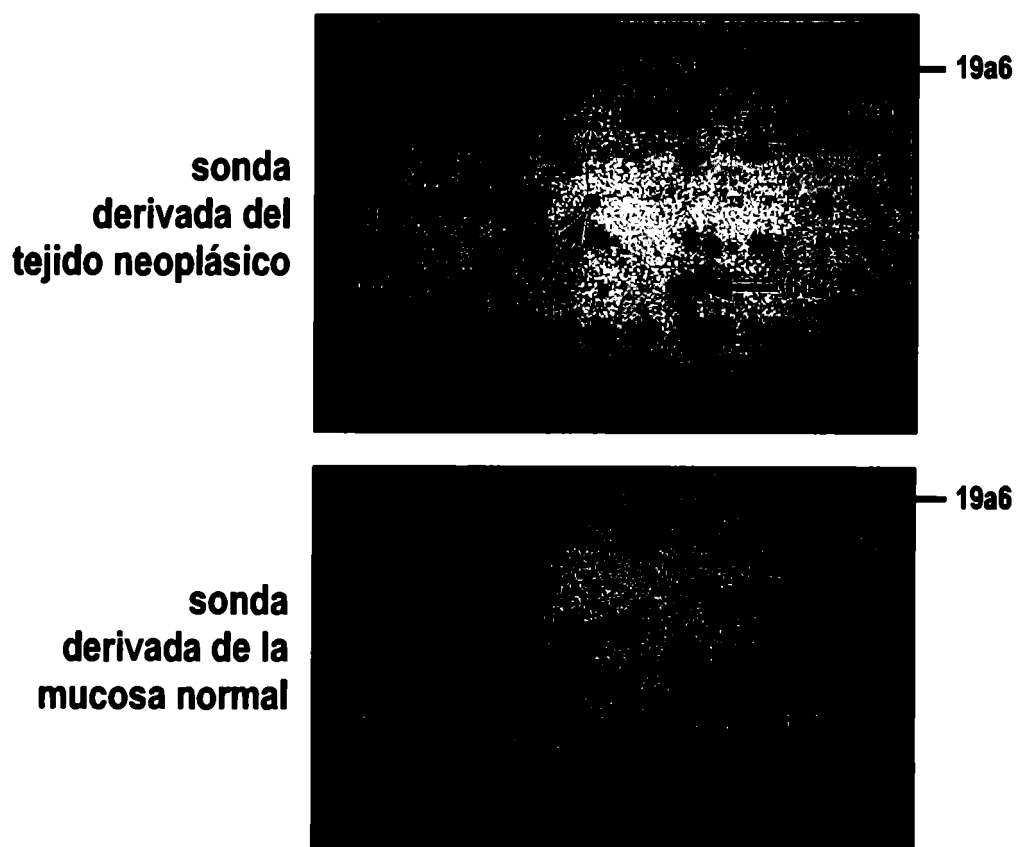
## Screening diferencial

### Expresión diferencial de genes sobre filtros con alta densidad de clones

En teoría, una aproximación general y sistemática del estudio de genes expresados diferencialmente puede llevarse a cabo, cuando una gran cantidad de clones puede ser depositada sobre una membrana y luego hibridarse con sondas complejas derivadas del ARN de diferentes células o tejidos (Lennon *et al.*, 1991). La señal observada deja una impronta cuantificable, que representa la cantidad de ARNm expresado por el correspondiente gen en el tejido del cual deriva la sonda. En la práctica, la teoría demostró tener una relativa validez al permitir sólo determinaciones cualitativas o semicuantitativas (Gress *et al.*, 1992; Auffray *et al.*, 1995). Se describió también, que la baja sensibilidad de la técnica no permite detectar los ARNm cuya abundancia relativa sea menor que 0,1% (Sargent *et al.*, 1987), sin embargo datos recientes indican que es posible cuantificar dichas señales (Zhao *et al.*, 1995).

Nosotros utilizamos este método, en colaboración con el grupo del Dr Bertrand Jordan de la Faculté des Sciences, Université d'Aix - Marseille II Luminy (Marseille, France), para estudiar la expresión de genes en el cáncer de colon humano. A este fin, se usó un *imaging plate device* y un software especialmente desarrollado para cuantificar la señal de hibridación. Esta combinación aumenta considerablemente el rango de la aplicación de esta técnica en términos de volumen y sensibilidad. Los ARNm cuya abundancia es del orden de 0,01% pueden ser detectados de esta forma (Nguyen *et al.*, 1995).

Sobre diez filtros se depositaron una alta densidad de clones (1118 colonias sobre una membrana de 12 x 8 cm) que corresponden a 740 transcritos sin homología aparente (no repetidos), 99 secuencias homólogas a otras previamente descritas en otras especies, 142 insertos homólogos a secuencias EST (*Expressed Sequence Tag*) y el resto fueron clones de nuestro interés previamente identificados que incluyen: factores de crecimiento, antígenos tumorales, factores nucleares, proteínas del citoesqueleto y diversas proteínas citoplasmáticas. Las distintas membranas fueron hibridadas con sondas complejas provenientes del ARNm de cinco pacientes diferentes (ver Materiales y Métodos).



**Figura 7:** Hibridación de un filtro con alta densidad de clones usando dos sondas complejas derivadas del tejido neoplásico de colon y de la mucosa normal adyacente del mismo paciente.

El mismo filtro fue sucesivamente hibridado con las dos sondas a comparar (derivadas del tumor y de la mucosa sana adyacente), para evitar las variaciones

debidas a diferencias de crecimiento de cada colonia sobre filtros independientes. En la **figura 7** se muestra la autoradiografía correspondiente a la hibridación de un filtro con las sondas derivadas del tejido neoplásico y la mucosa normal de un mismo paciente. En ella podemos ver la presencia de genes expresados con la misma intensidad en el tejido normal y en el tumor, mientras que otros genes parecen ser específicamente sub- o sobre-expresados en tejido tumoral. Es importante tener en cuenta que con esta técnica sólo se detectaron aquellos clones cuyo nivel de expresión era superior a 0,01% (Nguyen *et al.*, 1995). Es probable que un número mayor de genes sea expresado diferencialmente, pero todavía indetectables por este sistema.

Con ésta técnica encontramos que 234 clones fueron expresados diferencialmente en el carcinoma colorectal del primer paciente. Un número similar de clones se modifican también en los restantes 4 pacientes, sin embargo solamente 23 clones fueron constantemente sub-expresados y 51 sobre-expresados en los 5 tumores. La secuencia que corresponde a esos 74 insertos, fue completada y recomparada contra GenBank. Entre esos clones, algunos parecieron interesantes por su relación con la progresión del cáncer y sobre ellos centraré mi atención en los capítulos siguientes de esta tesis.

Un párrafo aparte le dedicaré al análisis de los controles utilizados para validar los resultados obtenidos con esta técnica.

### **Identificación de artificios en la hibridación**

#### **a) secuencias repetitivas**

Aproximadamente un 5% de los clones depositados sobre la membrana dieron una señal detectable con ADN repetitivo (Cot 1) humano (**fig 8**). Para disminuir esa señal hubiera podido saturarse la sonda con Cot 1 humano antes de la hibridación,

aunque nosotros preferimos llamar "repetitivos" a esos clones, en nuestra base de datos, y excluirlos de futuros análisis.



**Figura 8:** Señales de hibridación debidas a secuencias repetitivas. Aproximadamente un 5% de los clones hibridó en presencia de una sonda preparada a partir de ADN Cot 1 (repetitivo) humano.

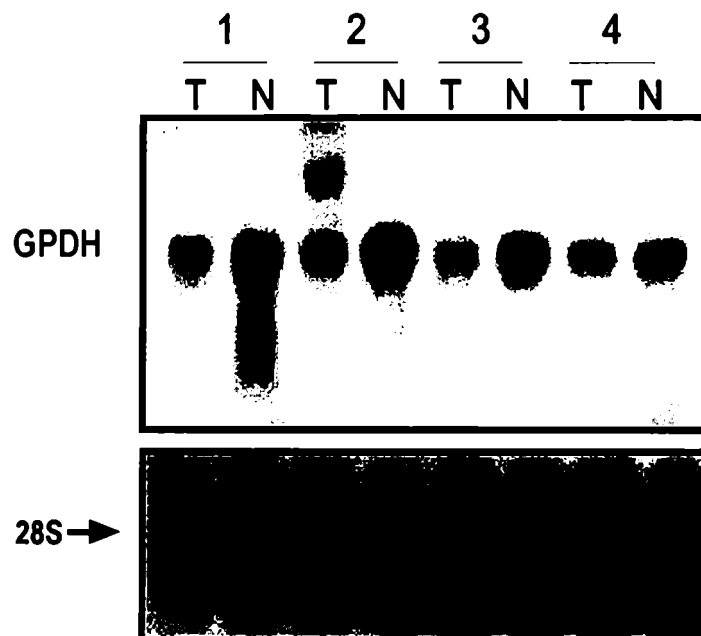
### b) secuencias con poli(A) extensos

El hecho de preparar las sondas a partir de secuencias iniciadoras poli(T), permite una hibridación cruzada con ADNc que tengan una secuencia poli(A) considerable (Gress *et al.*, 1992). Si este fuera el caso, el empleo de cortos iniciadores al azar (hexámeros) con un máximo de cuatro nucleótidos T, evitaría teóricamente la hibridación inespecífica con el poli(A). Esta fue la estrategia que utilizamos. Sin embargo, fue descrito que frecuentes contaminaciones con secuencias poli(T) liberadas de las columnas usadas para la purificación del ARNm, son igualmente las responsables de este artificio (Liang *et al.*, 1993). Con el grupo del Dr. Jordan, encontramos que este problema desaparecía reemplazando el uso de resinas comerciales oligo(dT)-celulosa por oligo(dT)-biotin acoplado al uso de bolillas magnéticas con avidina (Nguyen *et al.*, 1995). Este simple procedimiento eliminaba completamente este artificio (dato no mostrado).

### Control de expresión a través de clones conocidos

Los clones controles, de acuerdo a descripciones previas sobre su expresión en el cáncer de colon, fueron ordenadamente mezclados entre el resto de los clones a

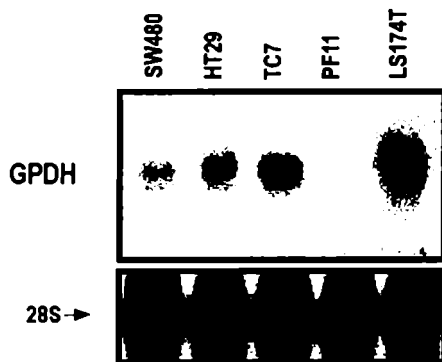
estudiar. Los ADNc correspondientes a la  $\beta$ -actina y EF1 $\alpha$  (*Elongation Factor-1 $\alpha$* ), no variaron significativamente de acuerdo a reportes previos (Gong *et al.*, 1996; Barnard *et al.*, 1993), en cambio se encontraron aumentados el EF1 $\gamma$  (*Elongation Factor-1 $\gamma$* ) y las proteínas ribosomales L18 y L37 (Chi *et al.*, 1992; Barnard *et al.*, 1993). Sorpresivamente la GPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) mostró valores irregulares en los distintos pacientes estudiados (en cuatro pacientes se la encontró significativamente sub-expresada). Un estudio más en detalle nos permitió comprobar por Northern *blot*, en otros cuatro pacientes, que se encontraba efectivamente sub-expresada en el tejido tumoral (fig 9).



**Figura 9:** Expresión de la GPDH en carcinoma colorectal. Análisis por Northern *blot* usando 20  $\mu$ g de ARN de tumor de colon (T) y su adyacente mucosa normal (N). Los pacientes (n=4), son identificados arriba de la figura. La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 hs

Actualmente, ampliamos el número de pacientes estudiados y encontramos que está sub-expresada en seis tumores de los diez analizados (dato no mostrado). Su expresión en distintas líneas celulares de colon humano, se mostró también

variable (fig 10). Reportes recientes muestran a la GPDH como una molécula regulable en células neoplásicas de hígado (Gong *et al.*, 1996).



**Figura 10:** Expresión de la GPDH en distintas líneas celulares de colon humanas. La cantidad de ARN depositada (20 µg) sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a -80°C por 48 hs.

Es interesante hacer notar que recientemente Calvo y colaboradores (1997) reportaron que el ARNm GPDH se induce más de diez veces en el páncreas de rata durante el curso de la pancreatitis aguda. Nuestros resultados y los descriptos recientemente en el cáncer de hígado y la pancreatitis aguda, muestran que la GPDH es una molécula "regulable" durante, o como consecuencia de, un desorden orgánico. Pero no se conoce en estos casos su repercusión biológica exacta.

En la figura 7, se pueden identificar algunos clones que mostraron estar sobre-expresados en las sondas provenientes del tejido canceroso, de por lo menos tres pacientes de los cinco estudiados (clones 19A6, 5B8 y 31A5), o sub-expresados en todos los tejidos tumorales (clones 6C2, 6G2 y 32D6).

Los valores de expresión variaron de un paciente a otro aunque algunas correlaciones fueron significativas. Por ejemplo, el clon 19A6 se encontró sobre-expresado cuando se utilizaron las sondas provenientes del tejido tumoral de los pacientes 2, 3 y 5. Este mismo perfil fue observado para los clones 5B8 y 31A5 donde la sobre-expresión (en la sonda proveniente del tejido tumoral) junto al 19A6, fue máxima siempre en el paciente 2. La misma correlación se encontró entre los clones 6G2 y 32D6. Estos mostraron estar sub-expresados cuando se utilizaron las

sondas provenientes del tejido tumoral de todos los enfermos estudiados, exponiendo niveles de sub-expresión similares en cada paciente analizado.

Todos estos clones fueron especialmente seleccionados para su estudio, por pertenecer a diferentes familias de genes que podrían estar involucradas en los fenómenos que conducen al desarrollo de un tumor colorectal (establecimiento, desarrollo y metástasis). Un primer criterio de selección consistió en elegir aquellos clones que se encontraban expresados diferencialmente en todos los pacientes analizados. Entre los 74 clones que así seleccionamos, elegimos los clones 6C2, 6G2 y 32D6 porque presentan suficiente homología con moléculas potencialmente involucradas en distintos estadios del cáncer. Los clones 19A6, 5B8 y 31A5 no entraban en este rango ya que no fueron expresados diferencialmente en los cinco pacientes estudiados. Sin embargo estos clones son tres miembros de una familia de lectinas de tipo C ( $Ca^{++}$  dependiente) implicadas en procesos de crecimiento celular. Además estos tres genes, se sobre-expresan concomitantemente en tres de los cinco pacientes estudiados, suponiendo mecanismos de regulación comunes. Los clones 5B8 y 31A5 corresponden a dos isoformas de la *reglithostathine* (PSP I y II, respectivamente) y el clon 19A6 a la PAP I. Se postula una fuerte implicación de la PSP en la regeneración y existen evidencias que adjudican un efecto antiapoptótico a la PAP I. Ambos procesos, la proliferación celular y la apoptosis, son eventos íntimamente relacionados con el cáncer. Razón por la que incluimos esta familia de genes en nuestro estudio. Finalmente, otro factor determinante en la elección de esta familia de genes, fue que disponíamos de muchas herramientas para ello.

El clon 6C2 mostró ser homólogo a la galectina-4 de cerdo. Su función, junto a otras galectinas, parece ser la de "anclar" las células a la matriz extracelular. Los clones 6G2 y 32D6 pertenecen a una familia de genes homeóticos (Cdx)

expresados selectivamente en el intestino y cuya función parece estar involucrada en el desarrollo y diferenciación de éste. La sub-expresión en los tumores de moléculas de adhesión y/o de factores responsables de la diferenciación celular, sugiere su participación en la progresión tumoral. Igualmente, la sobre-expresión de factores de crecimiento o antiapoptóticos, puede tener una relación directa con la evolución del tumor.

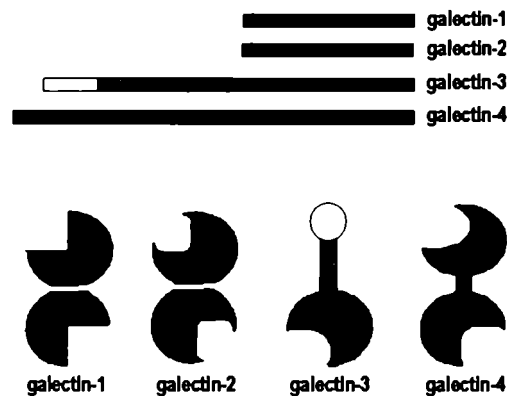
En los capítulos siguientes desarrollaré el estudio de estos clones y discutiré sus posibles implicaciones en el cáncer de colon.



## Galectina-4

### INTRODUCCION

Las lectinas forman un grupo de proteínas que pueden unirse específicamente a carbohidratos y son capaces de reconocer un glicoconjugado particular entre los millones que se expresan en las células animales. Las lectinas pueden ser clasificadas en dos grupos principales: las lectinas animales de tipo C ( $Ca^{++}$  dependiente) y las del tipo S (SH dependiente). Muchas de las lectinas que no se incluyen en los grupos mencionados, son mejor conocidas en otros contextos (por ejemplo, las proteínas que median la interacción entre la célula y la matriz celular como la fibronectina y la laminina).



**Figura 11:** Esquema de las estructuras de las galectinas-1,-2,-3 y -4. Las proteínas son mostradas esquemáticamente en un diagrama lineal (arriba) y un diagrama globular (abajo). Los dominios de unión a los carbohidratos de aprox 130 aa son negros. El dominio repetitivo de la galectina-3 (aprox 100 aa) y el péptido de unión de la galectina-4 son de color gris. El dominio N-terminal de la galectina-3 (aprox 30 aa) es blanco.

Al grupo S pertenecen las galectinas cuyos miembros están definidos por dos propiedades: su secuencia característica de aminoácidos y su afinidad por la  $\beta$ -

galactosa (Barondes *et al.*, 1994a). Recientemente, cada galectina de mamífero fue denominada según una numeración consecutiva creciente. La **fig 11** muestra un esquema de la estructura de las galectinas-1, -2, -3 y -4 (que son las mejor caracterizadas).

### Localización

Las distintas galectinas son expresadas diferencialmente en tejidos de mamíferos, aunque comparten en muchos casos su distribución. La mayoría de los estudios de localización se hicieron por inmunohistoquímica y el descubrimiento de una posible reacción cruzada, hace unos pocos años, complicó la interpretación de esos resultados. Sin embargo, basados sobre los datos aportados por el secuenciamiento de proteínas o ácidos nucleicos, es claro que la galectina-1 es abundante en músculo, timo, riñón y placenta (Poirier *et al.*, 1992) y en neuronas motoras y sensitivas (Regan *et al.*, 1986; Hynes *et al.*, 1990). La galectina-3 es altamente expresada en macrófagos activados, células basófilas y mastocitos o células cebadas (Liu, 1993; Sato *et al.*, 1994), en algunas células epiteliales de intestino y riñón (Foddy *et al.*, 1990; Lindstedt *et al.*, 1993; Lotz *et al.*, 1993) y en algunas neuronas sensitivas (Regan *et al.*, 1986; Cameron *et al.*, 1993). En algunos tejidos, la síntesis de galectina-3 se activa solamente durante estados de desarrollo o fisiológicos particulares (Harrison, 1991; Poirier *et al.*, 1992), y se la encontró, a bajos niveles, en fibroblastos (Roff *et al.*, 1983). Mucho menos se conoce sobre la distribución de la galectina-2 y -4, aunque se las encontró expresadas en algunos hepatomas (Gitt *et al.*, 1992) y en el epitelio intestinal (Oda *et al.*, 1993), respectivamente.

### **Secreción no clásica de las galectinas**

Las galectinas no muestran evidencia de péptidos señales que permitan sugerir que son moléculas secretadas, sin embargo muchas, claramente, lo son (Marschal *et al.*, 1992; Hirabayashi *et al.*, 1992; Pfeifer *et al.*, 1993; Hirabayashi *et al.*, 1993).

El hecho de ser moléculas sin péptidos señales clásicos podría implicar que son moléculas confinadas al citoplasma. No obstante, la galectina-1 y -3 son abundantes tanto en el citosol como en el medio extracelular y existen evidencias que muestran su externalización por un mecanismo de secreción no clásico (Cooper *et al.*, 1990; Lindstedt *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1994). Mecanismos no clásicos de secreción para proteínas que juegan un rol en el exterior de la célula, fueron igualmente reportados para la interleuquina-1 $\beta$  y el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (Siders *et al.*, 1993).

El mecanismo por el cual las galectinas son exteriorizadas de forma no clásica no es conocido aún, sin embargo algunas hipótesis están en estudio. Una posibilidad es que sean secretadas a partir de ligandos glicoconjugados complementarios, que se externalizan por la vía clásica. Otra posibilidad es que las galectinas puedan ser secretadas por múltiples vías no clásicas, permitiendo que distintas galectinas se activen en respuesta a señales específicas (Barondes *et al.*, 1994b).

### **Ligandos específicos**

A pesar de la gran cantidad de glicoconjugados que poseen  $\beta$ -galactosa en el medio celular, pocas glicoproteínas de extractos celulares se unen específicamente a una galectina particular *in vitro* (Cooper *et al.*, 1991; Skrinicosky *et al.*, 1993), sugiriendo que esa interacción tiene una significación fisiológica.

### **Función**

La idea general de las lectinas animales relaciona su función con la interacción célula-célula o célula-matriz (Barondes *et al.*, 1984). Estudios recientes indican una relación funcional entre las galectinas y la adhesión celular. La galectina-1 fue reportada como un inhibidor de la adhesión celular en el músculo esquelético, donde esta molécula es secretada durante la diferenciación y se une a la laminina, inhibiendo la interacción célula-matriz (Cooper *et al.*, 1991). Se postula que su actividad inhibidora deriva de la interferencia producida por la galectina con respecto al receptor mioblástico para la laminina, la integrina  $\alpha7\beta1$  (Gu *et al.*, 1994). Como consecuencia, se propuso que la inhibición de la adhesión de la célula a la matriz extracelular tiene un rol importante en el desarrollo del músculo (Cooper *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1994). Por otro lado, también se describió una actividad adherente de la galectina-1 en otros tipos celulares (Skřincosky *et al.*, 1993; Mahanthappa *et al.*, 1994). En los experimentos de *knock-out* para la galectina-1, se obtuvieron ratones normales por lo cual se postula la existencia de proteínas alternativas o de mecanismos biológicos que compensan su actividad (Poirier *et al.*, 1993). Esta molécula había sido propuesta como reguladora del crecimiento en ratones (Wells *et al.*, 1991). Finalmente, la galectina-3 fue implicada en la transformación celular y en el proceso de metástasis en los pacientes con cáncer de colon (Irimura *et al.*, 1991).

## ***RESULTADOS***

### **Clonado del ADNc de la galectina-4 humana**

El clon 6C2 fue elegido según se describió en la sección anterior de este capítulo y su inserto resultó tener 1030 nt. Un análisis, por comparación de su secuencia,

mostró que este clon era la contraparte humana de la galectina-4 porcina. Para completar la secuencia del ADNc, nos basamos en la fuerte homología entre nuestra secuencia y la de cerdo (85%) y diseñamos una estrategia basada en RT-PCR. La primera cadena de ADNc fue amplificada por PCR a partir de un oligonucleótido anti-*sense* específico en 3', diseñado a partir de nuestro inserto, y de otro heterólogo *sense* en 5', diseñado a partir de la secuencia de cerdo (ver Materiales y Métodos). Después del clonado, el secuenciamiento y el ensamblado del producto de PCR, la secuencia completa mostró 1110 nt. La **figura12** muestra la secuencia del ADNc el cual contiene un marco de lectura abierto entre los nucleótidos 14 y 982, codificando un producto de 323 aminoácidos. El codón de iniciación propuesto (ATG en la posición 14) es conforme a los descriptos por Kozak (Kozak, 1991) y de acuerdo a los reportados en rata (Oda *et al.*, 1993) y en cerdo (Chiu *et al.*, 1994). El codón de terminación (TAA en la posición 983) es seguido por 89 nucleótidos que corresponden a la secuencia 3' no traducida e incluyen una señal de poliadenilación (AATAAA) en la posición 952. Como otras lectinas descritas, la galectina-4 humana no tiene un péptido señal clásico para su secreción (Beyer *et al.*, 1982; Sparrow *et al.*, 1987). Tres sitios (N-) potenciales de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), fueron identificados en su secuencia.

#### **Estudio de la secuencia proteica**

El estudio de homología interna de su secuencia sugiere la presencia de dos CRD (CarbohydraRe Recognition Domain), cada uno de 150 aa con una homología del 34% (**fig 13**), unidos por un corto segmento de 25 aa. La secuencia de ambos dominios contiene motivos que han sido conservados entre muchos CRD de galectinas analizados (Drickamer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1991b).

## RESULTADOS Y DISCUSION

|   |   |    |
|---|---|----|
| gcacgctcgagcg   | ATG GCC TAT GTC CCC GCA CCG GGC TAC CAG CCC ACC TAC AAC CCG ACG | 61 |
|   | Met Ala Tyr Val Pro Ala Pro Gly Tyr Gln Pro Thr Tyr Asn Pro Thr | 16 |
| CTG CCT TAC TAC CAG CCC ATC CCG GGC GGG CTC AAC GTG GGA ATG TCT GTT TAC ATC CAA | 121   |    |
| Leu Pro Tyr Tyr Gln Pro Ile Pro Gly Gly Leu Asn Val Gly Met Ser Val Tyr Ile Gln | 36  |    |
| GGA GTG GCC AGC GAG CAC ATG AAG CCG TTC TTC GTG AAC TTT GTG GTT GGG CAG GAT CCG | 181   |    |
| Gly Val Ala Ser Glu His Met Lys Arg Phe Phe Val Asn Phe Val Val Gly Gln Asp Pro | 56  |    |
| GGC TCA GAC GTC GCC TTC CAC TTC AAT CCG CCG TTT GAC GGC TGG GAC AAG GTG GTC TTC | 241   |    |
| Gly Ser Asp Val Ala Phe His Phe Asn Pro Arg Phe Asp Gly Trp Asp Lys Val Val Phe | 76  |    |
| AAC ACG TTG CAG GGC GGG AAG TGG GGC AGC GAG GAG AGG AAG AGG AGC ATG CCC TTC AAA | 301   |    |
| Asn Thr Leu Gln Gly Gly Lys Trp Gly Ser Glu Glu Arg Lys Arg Ser Met Pro Phe Lys | 96  |    |
| AAG GGT GCC GCC TTT GAG CTG GTC TTC ATA GTC CTG GCT GAG CAC TAC AAG GTG GTG GTA | 361   |    |
| Lys Gly Ala Ala Phe Glu Leu Val Phe Ile Val Leu Ala Glu His Tyr Lys Val Val Val | 116   |    |
| AAT GGA AAT CCC TTC TAT GAG TAC GGG CAC CCG CTT CCC CTA CAG ATG GTC ACC CAC CTG | 421   |    |
| Asn Gly Asn Pro Phe Tyr Glu Tyr Gly His Arg Leu Pro Leu Gln Met Val Thr His Leu | 136   |    |
| CAA GTG GAT GGG GAT CTG CAA CTT CAA TCA ATC AAC TTC ATC GGA GGC CAG CCC CTC CGG | 481   |    |
| Gln Val Asp Gly Asp Leu Gln Leu Gln Ser Ile Asn Phe Ile Gly Gly Gln Pro Leu Arg | 156   |    |
| CCC CAG GGA CCC CCG ATG ATG CCA CCT TAC CCT GGT CCC GGA CAT TGC CAT CAA CAG CTG | 541   |    |
| Pro Gln Gly Pro Pro Met Met Pro Pro Tyr Pro Gly Pro Gly His Cys His Gln Gln Leu | 176   |    |
| AAC AGC CTG CCC ACC ATG GAA GGA CCC CCA ACC TTC AAC CCG CCT GTG CCA TAT TTC GGG | 601   |    |
| Asn Ser Leu Pro Thr Met Glu Gly Pro Pro Thr Phe Asn Pro Pro Val Pro Tyr Phe Gly | 196   |    |
| AGG CTG CAA GGA GGG CTC ACA GCT CGA AGA ACC ATC ATC ATC AAG GGC TAT GTG CCT CCC | 661   |    |
| Arg Leu Gln Gly Gly Leu Thr Ala Arg Arg Thr Ile Ile Ile Lys Gly Tyr Val Pro Pro | 216   |    |
| ACA GGC AAG AGC TTT GCT ATC AAC TTC AAG GTG GGC TCC TCA GGG GAC ATA GCT CTG CAC | 721   |    |
| Thr Gly Lys Ser Phe Ala Ile Asn Phe Lys Val Gly Ser Ser Gly Asp Ile Ala Leu His | 236   |    |
| ATT AAT CCC CGC ATG GGC AAC GGT ACC GTG GTC CCG AAC AGC CTT CTG AAT GGC TCG TGG | 781   |    |
| Ile Asn Pro Arg Met Gly Asn Gly Thr Val Val Arg Asn Ser Leu Leu Asn Gly Ser Trp | 256   |    |
| GGA TCC GAG GAG AAG AAG ATC ACC CAC AAC CCA TTT GGT CCC GGA CAG TTC TTT GAT CTG | 841   |    |
| Gly Ser Glu Glu Lys Lys Ile Thr His Asn Pro Phe Gly Pro Gly Gln Phe Phe Asp Leu | 276   |    |
| TCC ATT CGC TGT GGC TTG GAT CGC TTC AAG GTT TAC GCC AAT GGC CAG CAC CTC TTT GAC | 901   |    |
| Ser Ile Arg Cys Gly Leu Asp Arg Phe Lys Val Tyr Ala Asn Gly Gln His Leu Phe Asp | 296   |    |
| TTT GCC CAT CGC CTC TCG GCC TTC CAG AGG GTG GAC ACA TTG GAA ATC CAG GGT GAT GTC | 961   |    |
| Phe Ala His Arg Leu Ser Ala Phe Gln Arg Val Asp Thr Leu Glu Ile Gln Gly Asp Val | 316   |    |
| ACC TTG TCC TAT GTC CAG ATC TAA tctattcctggggccataactcatgggaaaacagaattatcccctag | 1032  |    |
| Thr Leu Ser Tyr Val Gln Ile End   | 323   |    |
| gactcctttctaagccccaataaaatgtctgagggtgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa      | 1110  |    |

**Figura 12:** Secuencia del ARNm de la galectina-4 humana y deducción de su correspondiente proteína. La secuencia de nucleótidos del ARNm fue deducida a partir del clon 6C2 (nt 90-1110) y del producto clonado por RT-PCR (ver Materiales y Métodos) correspondiente al extremo 5' del ARNm de la galectina-4 (nt 1-551). Los nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto para la proteína (323 aa) están representados en letra mayúscula. Las secuencias no codantes están escritas en letra cursiva normal. El sitio de poliadenilación está subrayado.

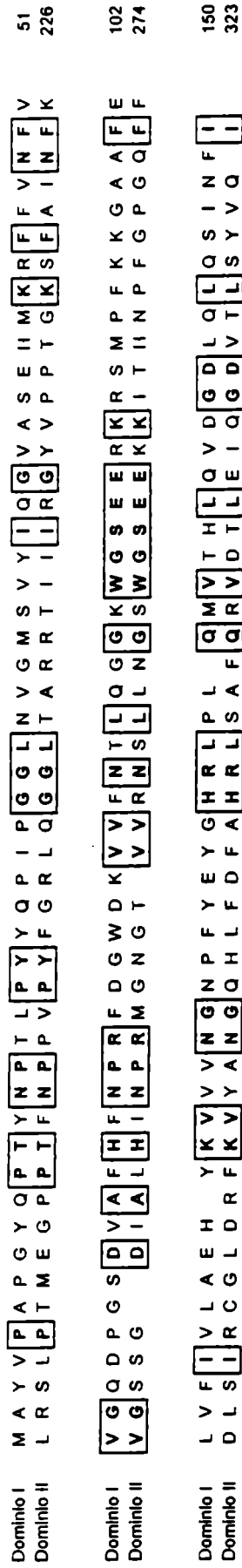


Figura 13: Homología interna de la galectina-4 humana. Los dos CRDs de la galectina-4 humana, son alineados para analizar su homología. Los residuos idénticos son recuadrados.

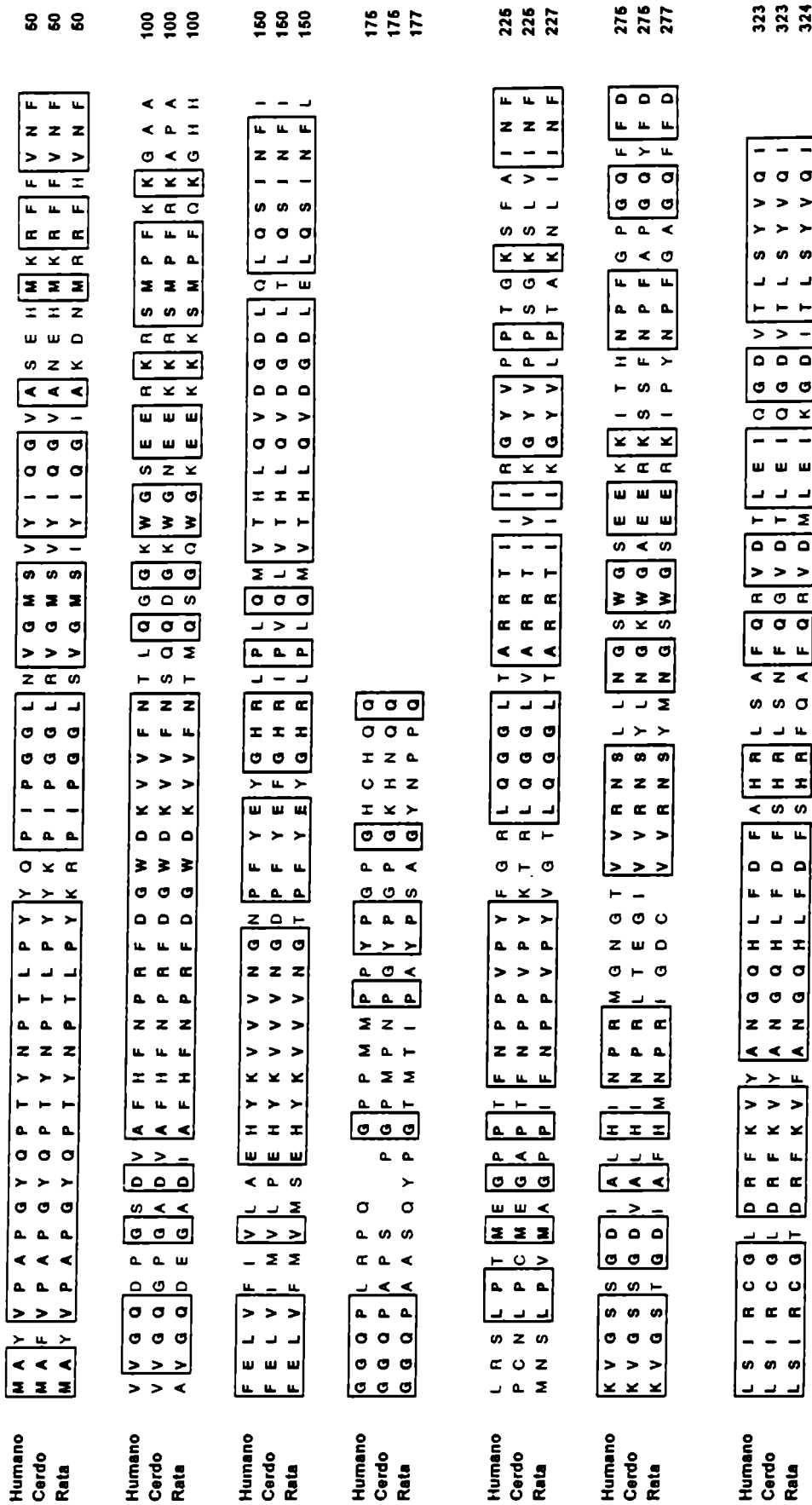


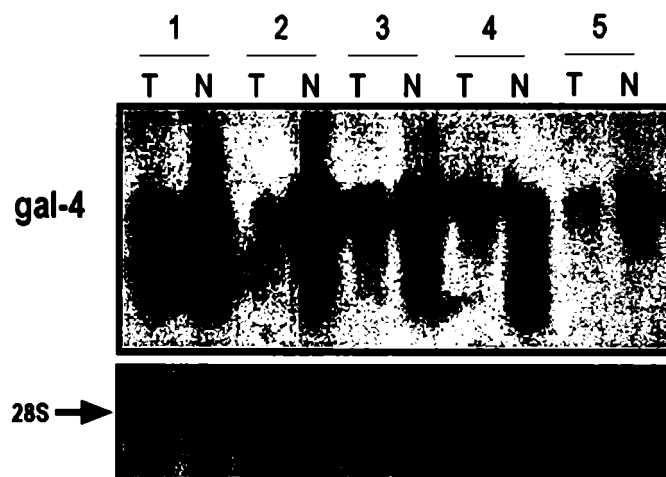
Figura 14: Homología entre los miembros de la subfamilia galectina-4 de mamíferos. Las secuencias de las galectina-4 humana, de cerdo y de rata son alineadas. Las áreas recuadradas corresponden a aminoácidos idénticos.



La comparación de la secuencia proteica propuesta para la galectina-4 humana mostró un 79% de identidad con la de cerdo y un 76% con la de rata (fig 14). Los CRD son fuertemente conservados entre los tres miembros (aprox un 70%), no así la región de unión entre los dos dominios, la que mostró una homología de sólo un 40% (dato no mostrado). Recientemente se reportó una nueva galectina (galectina-8) con una homología interna entre sus dominios CRD, C-terminal y N-terminal (Hadani *et al.*, 1995) y con una homología del 35% a la galectina-4 humana.

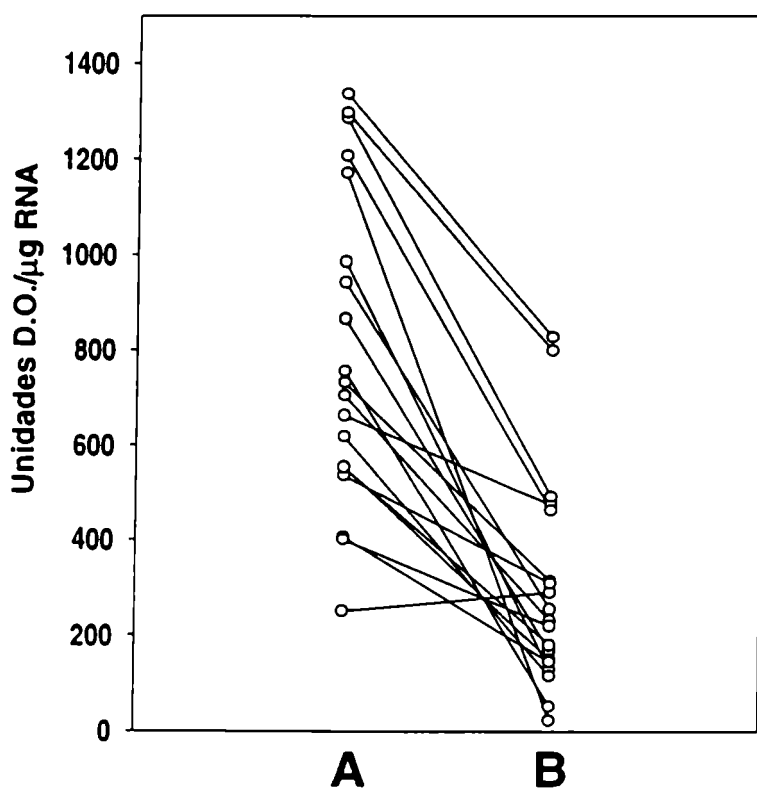
#### Estudio de la expresión del ARNm de la galectina-4 humana

Para confirmar los resultados obtenidos por el *screening* diferencial, la expresión del ARNm de la galectina-4 fue estudiado por Northern *blot* sobre otros cinco pacientes. El ARN de tejidos de adenocarcinoma de colon y del colon normal adyacente fueron hibridados (según Materiales y Métodos) y la figura 15 muestra la autoradiografía obtenida.



**Figura 15:** Expresión de la Galectina-4 humana en carcinoma colorectal. Análisis por Northern *blot* usando 20  $\mu$ g de ARN de tumor de colon (T) y su mucosa normal adyacente (N). Los pacientes (n=5), son identificados arriba de la figura. La sonda ( $\alpha$ [ $^{32}$ P]dCTP) fue preparada a partir del inserto 6C2 (por *random priming*). La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 hs.

Un análisis densitométrico mostró una disminución entre 2,4 y 130 veces de la expresión de la galectina-4 en el tejido tumoral. Esos resultados nos impulsaron a estudiar un número mayor de pacientes por *dot blot*, para establecer algún tipo de relación entre los niveles de la galectina-4 y la progresión del tumor. Los estudios fueron realizados sobre 19 pacientes y la **figura 16** muestra el resultado del análisis densitométrico del *dot blot*. Esta figura muestra que la galectina-4 está sub-expresada en 18 de los 19 pacientes. A pesar de la frecuente sub-expresión, ninguna correlación fue encontrada entre el nivel del ARNm de la galectina-4 y el estado Dukes o el tipo histológico de los tumores.



**Figura 16:** La concentración de la Galectina-4 fue estimada por *dot blot* de igual cantidad de ARN (5 µg) a partir de cáncer colorectal (B) y su correspondiente mucosa normal (A). Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO)/µg de ARN obtenidas después de cuantificar los autorradiogramas de los *blots*.

La distribución del transcrito para la galectina-4 fue estudiado en distintos tejidos humanos normales (no neoplásicos) por Northern blot (fig 17). Una banda mayoritaria hibrida con el inserto 6C2 clonado por nosotros, y muestra un tamaño de aproximadamente 1,2 kb. Las señales presentadas muestran que la expresión de la galectina-4 fue confinada al sistema digestivo, en particular al intestino delgado, colon y recto, no siendo detectadas en timo, vesícula biliar, glándula adrenal, estómago, páncreas, hígado y piel. El patrón de distribución descrito coincide con el encontrado en la rata, excepto que en este animal se la detecta también en el estómago. Con la idea de realizar estudios posteriores *in vitro*, analizamos la expresión de este ARNm en las distintas líneas celulares derivadas de tumores de color. En la figura 17 se ven cantidades detectables sólo en HT29 y LS174T.

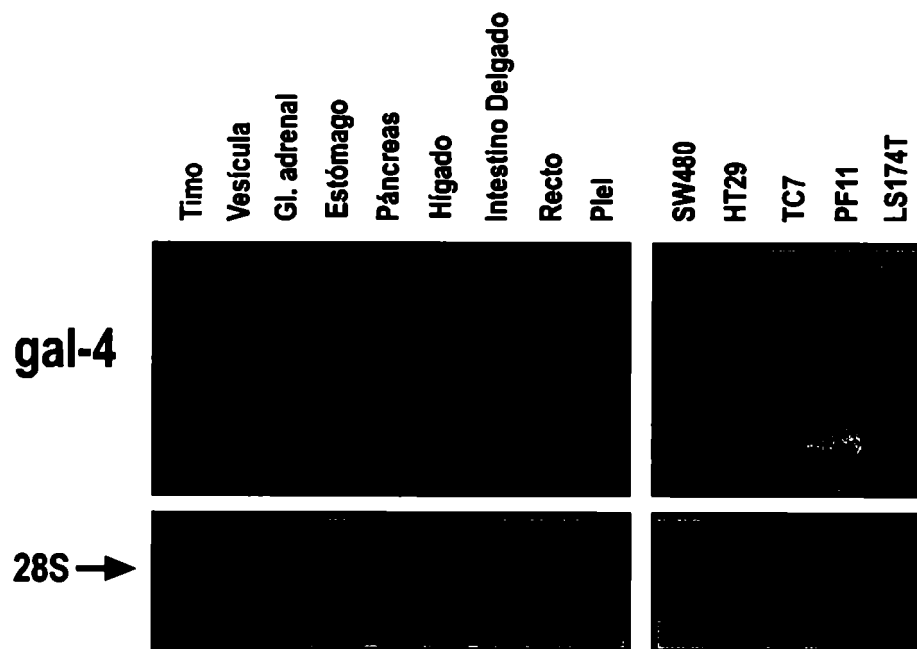


Figura 17: La distribución del ARNm total de varios tejidos humanos y cinco líneas celulares de colon, fue analizado por Northern blot de 20 µg de cada ARN. La sonda ( $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP) fue preparada a partir del inserto 6C2 (por *random priming*). La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 hs.

## DISCUSION

La galectina-4 fue clonada previamente en rata (Oda *et al.*, 1993) y cerdo (Chiu *et al.*, 1994) y mostró tener 323 y 324 aminoácidos respectivamente, distribuidos en dos CDR unidos por un corto péptido. La función de la galectina-4 es hasta el momento desconocida. Aunque la de cerdo se une a una glicoproteína de 120 kDa y podría estar involucrada en la formación de *adherens junctions* (Chiu *et al.*, 1994). En la introducción de este capítulo fueron comentadas algunas funciones adjudicadas a esta familia de lectinas (la adhesión celular, la regulación del crecimiento, la transformación celular y la metástasis), todos eventos implicados en procesos tumorales. Uno podría especular que la pérdida en la expresión de la galectina-4 es responsable, en parte, de esas modificaciones. La sub-expresión de la galectina-4 podría participar en el proceso de metástasis, un mecanismo complejo que comprende la pérdida de interacciones célula-célula y entre éstas y la matriz circundante. Estas interacciones dependen de moléculas de la superficie celular (como la galectina-4) que median el reconocimiento y la adhesión (Miller *et al.*, 1985; Irimura *et al.*, 1987). Eventos aún desconocidos podrían ser los responsables de la sub-expresión de la galectina-4 y así facilitar el origen de las metástasis.

Previamente fue reportado que la sobreproducción de galectina-3 en una línea celular de fibrosarcoma que expresa un débil fenotipo metastático, da como resultado un gran incremento de su potencial (Raz *et al.*, 1990). Existe un particular interés en esta lectina desde que se describió un incremento en pacientes con cáncer de colon metastático (Dukes D), respecto a pacientes sin metástasis evidente (Dukes B) (Irimura *et al.*, 1991). Raz y colaboradores, mostraron que un aumento en la expresión de la galectina-1 en la membrana celular, correlaciona con

la capacidad de dar metástasis (Raz *et al.*, 1986). A la luz de todos estos resultados, no resulta sorprendente la pérdida de la expresión de la galectina-4 en el cáncer de colon. La pérdida en sus niveles de transcripción así como la especificidad de su expresión, nos permitiría también sugerir que la galectina-4 podría jugar un papel en el mantenimiento del fenotipo normal de la célula, como ya fuera descrito para la galectina-7 (Madsen *et al.*, 1995).

Finalmente, se diseñó un estudio clínico en 19 pacientes que falló en correlacionar la expresión de la galectina-4 con el estadio del tumor (clasificación Dukes) o con su grado de diferenciación. Ninguna correlación se encontró, tampoco, respecto de la edad de los pacientes, el sexo, la localización del tumor o su tamaño. Quizá, la sub-regulación de la galectina-4 sea un evento muy temprano en la carcinogénesis de colon y por eso no observamos significativas diferencias entre los pacientes estudiados, pese a que abarcaban todos los estados diagnósticos (Dukes A, B, C y D). Apoyando esta hipótesis nosotros observamos una inhibición de su expresión en los dos únicos pólipos analizados (dato no mostrado).

Resumiendo, la sub-expresión de la galectina-4 puede ser un evento temprano y frecuente durante el proceso de cancerización del colon. Estudios posteriores caracterizando sus ligandos, su localización subcelular y su función, nos ayudarán a entender, al menos en parte, su rol en la fisiopatología del cáncer colorectal.

## PAP y PSP

### INTRODUCCION

La PAP (Pancreatitis Associated Protein) y la PSP (Pancreatic Stone Protein) o *reglithostathine*, pertenecen a una familia de proteínas relacionadas estructuralmente, cuyos genes están organizados de una manera similar y tienen una misma localización cromosómica, sugiriendo que derivan de un mismo gen ancestral (Duseti *et al.*, 1995). Esta familia está compuesta, por lo menos, de tres PAP (I, II y III) y una PSP (*reglithostathine*) en la rata (Duseti *et al.*, 1995) y sólo una PAP I y en cambio dos PSP (I y II) en el humano. Todos estos transcritos y sus genes fueron identificados anteriormente en nuestro laboratorio. La secuencia proteica de todas ellas presenta un característico CRD (Carbohydrate Recognition Domain) típico de las lectinas de tipo C (Ca<sup>++</sup> dependientes) como fuera originalmente descrito por (Orelle *et al.*, 1992). Si bien pertenecen al grupo de las lectinas, las caracteriza el hecho de ser secretorias y poseer sólo el CRD. Drickamer las clasificó como un grupo independiente dentro de las lectinas, en el grupo VII (Drickamer *et al.*, 1993).

El ARNm de la PSP se expresa constitutivamente en las células pancreáticas acinares pero no en los islotes o en las células del epitelio ductal. Sin embargo una marcada sobre-expresión ocurre paralelamente a la regeneración de los islotes, después de una pancreatitis o durante la regeneración pancreática que sigue a la pancreatectomía subtotal (Rouquier *et al.*, 1991).

La PAP I no se expresa en el páncreas sano, pero una fuerte inducción se observa durante el proceso de regeneración que sigue a la pancreatitis aguda. Por otro

lado, la PAP I no se expresa solamente en el páncreas durante el curso de la pancreatitis aguda, curiosamente, es expresada constitutivamente en las células de la base de la cripta en el intestino delgado (Iovanna *et al.*, 1993; Itho *et al.*, 1993; Masciotra *et al.*, 1995) y es secretada por células de la glándula pituitaria de rata cuando son estimuladas con el factor de liberación de la hormona de crecimiento (Tachibana *et al.*, 1988; Katsumata *et al.*, 1995).

Buscando genes expresados diferencialmente en el carcinoma hepatocelular humano, Lasserre y colaboradores identificaron una molécula, que llamaron HIP (Lasserre *et al.*, 1992), cuya secuencia es idéntica a la PAP I. En ese trabajo se reporta una sobre-expresión de la PAP I en 7 de 29 carcinomas hepatocelulares pero no en hígado normal o fetal. Recientemente en nuestro laboratorio fue demostrado el mecanismo que activa el promotor del gen de la PAP I en el hepatocarcinoma (Dusetti *et al.*, 1996).

A pesar de todos los conocimientos estructurales o de las características de expresión de esta familia de moléculas, el conocimiento de su función es relativamente pobre y en algunos casos contradictorio.

La expresión de la PAP I en el cáncer de hígado fue la primera evidencia concreta que relaciona a esta familia de lectinas con el cáncer. Posteriormente en nuestro laboratorio, se encontró la sobre-expresión de la PAP I en otros tejidos tumorales como el colangiocarcinoma y en el cáncer de estómago. Otras proteínas como la AFP (*Alfa-Fetoprotein*) se inducen también en ciertos cánceres del aparato digestivo, pero probablemente como consecuencia de la desdiferenciación celular que en ellos ocurre. A diferencia de la PAP, la AFP es expresada durante el desarrollo y la regeneración de ciertos órganos del aparato digestivo. Esto hace suponer un mecanismo de activación diferente (Tsutsumi *et al.*, 1994; Dusetti *et al.*, 1996). Sin embargo hay varias razones que hacen suponer un rol de estas

moléculas en el crecimiento celular. Primero, estos genes se expresan en el páncreas cuando éste prolifera (regeneración post-pancreatitis, post-pancreatectomía o durante la regeneración de los islotes de Langerhans). Segundo, la PAP es inducible en la hipófisis, en respuesta al factor de liberación de la hormona de crecimiento. Tercero, estas moléculas son producidas por las células de la base de las criptas del intestino, en donde hay una gran proliferación celular. Cuarto, a pesar de que estos genes no se expresan en el hígado normal, ellos son sobre-expresados durante la hepatocarcinogénesis.

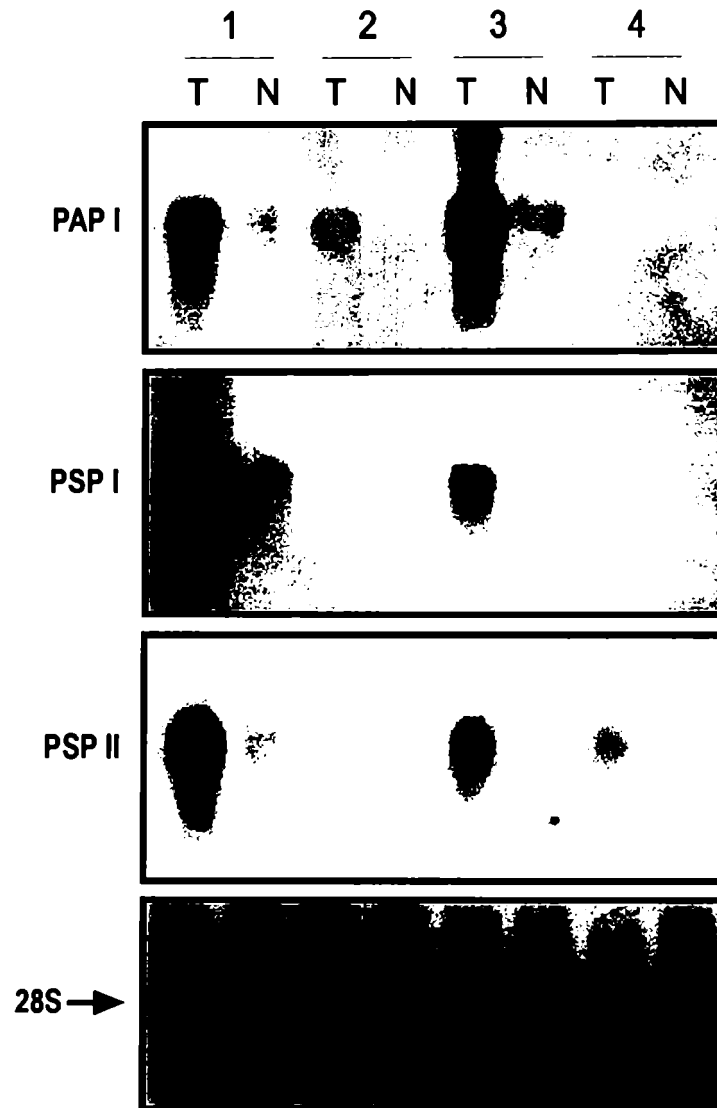
### ***RESULTADOS***

#### **Estudio de la expresión de la PAP I, PSP I y II en el cáncer de colon**

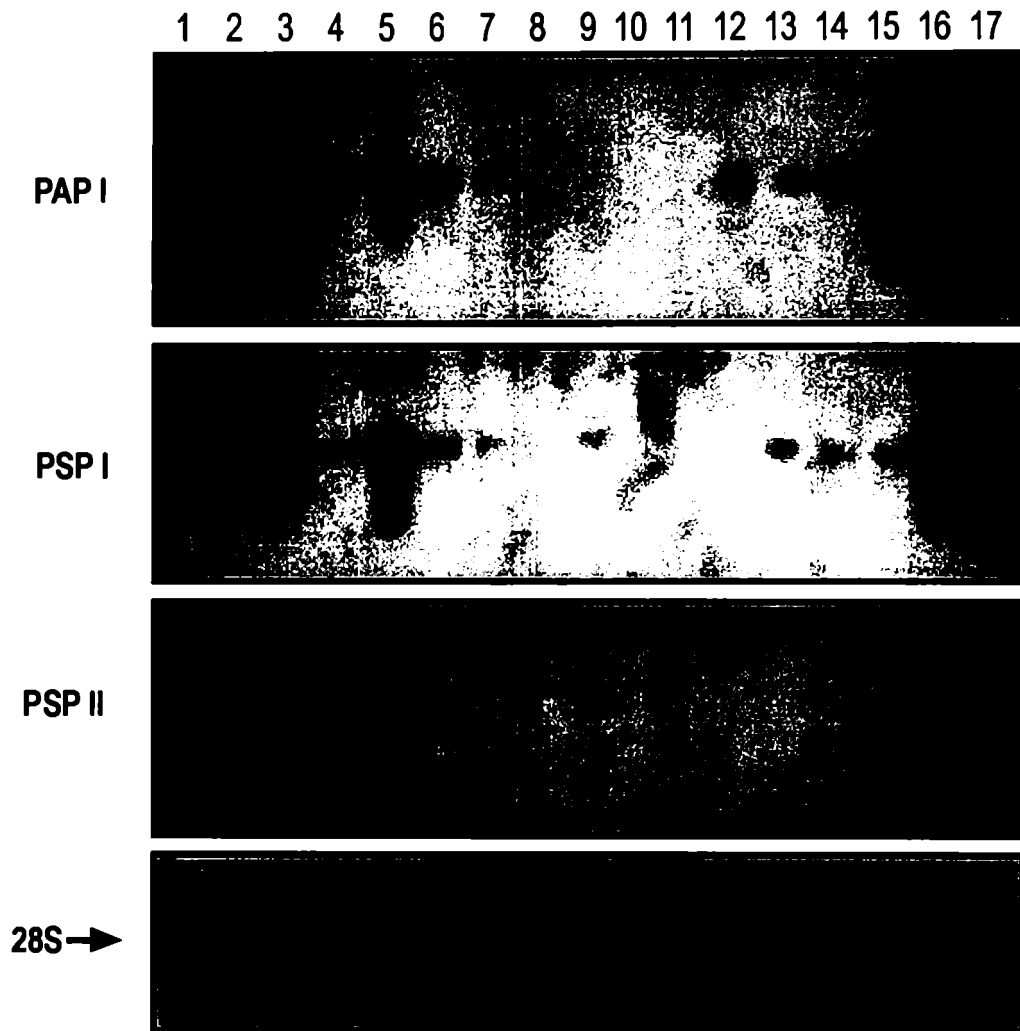
Para confirmar los resultados obtenidos por el *screening* diferencial sobre las membranas con alta densidad de clones, la expresión de estos genes se estudió por Northern *blot* sobre otros 4 pacientes. Los tejidos de adenocarcinoma de colon y la mucosa normal adyacente fueron hibridados con las sondas correspondientes a la PAP I, PSP I y la PSP II (véase Materiales y Métodos) y mostrados en la **figura 18**. Los resultados coinciden con los encontrados en el *screening* diferencial en cuanto a que las tres moléculas estudiadas se sobre-expresan en aproximadamente la mitad de los pacientes estudiados. Sin embargo, lo que más llama la atención es que los tres ARNm se sobre-expresan en los mismos pacientes, lo que también coincide con los resultados del *screening* diferencial. Estos resultados fueron ampliados y confirmados sobre otros 17 tumores de colon (**fig19**). Curiosamente, como es el caso de la galectina-4, la sobre-expresión de la PAP I, la PSP I y la PSP II no correlaciona con ninguno de los patrones clínicos o



histológicos estudiados (estado Dukes, grado de diferenciación, tipo de evolución, etc).



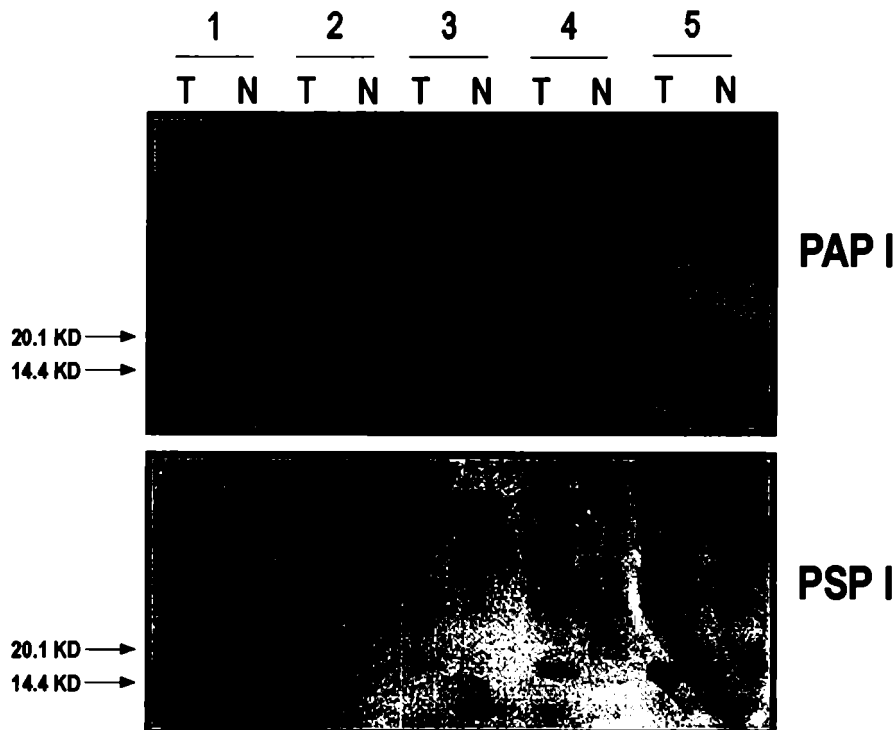
**Figura 18:** Expresión de la PAP I, PSP I y PSP II humanas en el carcinoma colorectal. Análisis por Northern blot usando 20 µg de ARN de tumor de colon (T) y su mucosa normal adyacente (N). Los pacientes (n=4), son identificados arriba de la figura. Las sondas ( $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ ) fueron preparadas a partir de los insertos 19A6, 5B8 y 31A5 respectivamente (por *random priming*). La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 hs.



**Figura 19:** Expresión de la PAPI, PSP I y PSP II humanas en 17 carcinomas colorectales. Análisis por Northern blot usando 20 µg de ARN de tumor de colon. Los pacientes son identificados arriba de la figura. Las sondas ( $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) fueron preparadas a partir de los insertos 19A6, 5B8 y 31A5 respectivamente (por *random priming*). La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 hs.

**Estudio de la expresión proteica de la PAP I, PSP I en el cáncer de colon**

La presencia de ARNm sólo indica activación de la transcripción de sus genes y/o aumento de su vida media. Probablemente la función de esos genes esté mediada por el producto de la traducción de los ARNm correspondientes. Para verificar la presencia proteica de la PAP I y la PSP I, nosotros extrajimos la fracción proteica soluble de 5 tumores y la mucosa normal peritumoral correspondiente y luego de su fraccionamiento sobre gel desnaturizante (PAGE-SDS), las proteínas fueron identificadas con anticuerpos específicos. Como se ve en la **figura 20**, una banda de aproximadamente 15 Kd (peso molecular esperado) es observada con ambos anticuerpos en algunos tumores.



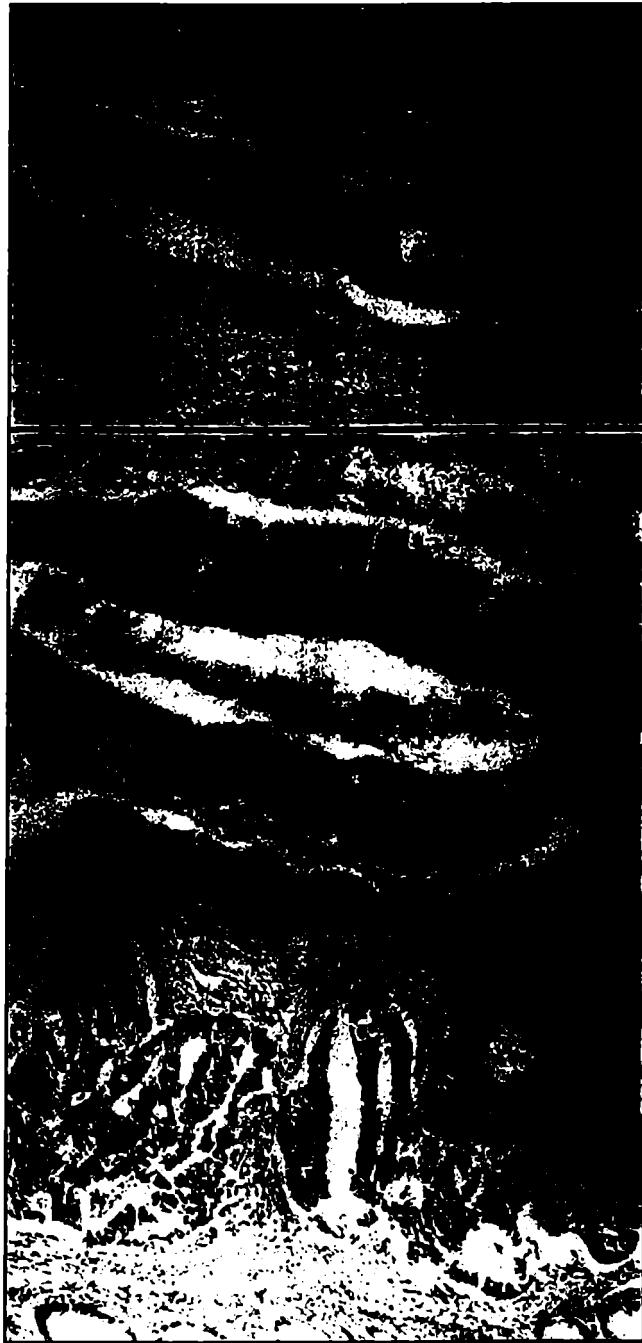
**Figura 20:** Inmunodetección de PAP I y PSP I humanas en carcinoma colorectal. Análisis por Western *blot* usando 100 µg de proteína total de tumor de colon (T) y su mucosa normal adyacente (N). Los pacientes (n=5), son identificados arriba de la figura.

### **Inmunolocalización**

Se realizó un estudio inmunohistológico en 4 tumores de colon. El objetivo de esta experiencia era determinar en que tipo celular se producen estas proteínas. Nosotros disponemos de anticuerpos monoespecíficos anti-PAP I y sólo anti-PSP I. La incubación de los tejidos con antisuero no inmune no mostró ninguna marcación. Las células epiteliales de algunos tumores resultaron ser positivas a ambos anticuerpos (**fig 21**). No se halló reacción en las células no epiteliales como fibroblastos o linfocitos o el resto del estroma. Como era de esperar la PAP I y la PSP I se expresaron en las mismas células. Es interesante notar que la intensidad de la marcación correlacionó con el nivel de ARNm correspondiente para la PAP I y la PSP I. Por ejemplo el paciente 16 (ver **fig 19**) que mostró muy altos niveles de ARNm de PAP I, mostró igualmente una fuerte positividad en el estudio inmunológico con el anticuerpo anti-PAP. Al contrario, el paciente 9 (ver **fig 19**) que muestra niveles indetectables del transcritto, se mostró igualmente negativo para la inmunohistoquímica. Finalmente, el paciente 6 (ver **fig 19**), que mostró una expresión moderada del ARNm, mostró una marcación débil con los anticuerpos (datos no mostrados).

### ***DISCUSION***

Como fue referido anteriormente, la expresión de la PAP I en tejidos tumorales ya ha sido descripta (Lasserre et al., 1992). En consecuencia, que estos genes estén activados en un número importante de tumores de colon, no es ni original ni sorprendente. La expresión irregular, aunque concomitante, de estos genes valida por un lado nuestro sistema de selección de clones y por el otro, justifica la utilización de sondas complejas provenientes de un número importante de pacientes.



**Figura 21:** Inmunolocalización de PAP I y PSP I en cáncer de colon con anticuerpos específicos. En la figura se observan señales positivas que corresponden al tumor del paciente 16 (ver fig 19). **A** marcación específica contra la PAP I (250x). **B** marcación específica contra la PSP (500x). **C** control. (160x).

Las variaciones de expresión entre un tumor y otro son importantes, en consecuencia la utilización de un solo tumor y su tejido "sano" adyacente llevaría a un número difícilmente manejable de clones, al menos cuando se trabaja con tejido de origen colónico.

La organización genómica es muy similar entre los genes PAP I, PSP I y PSP II, y las similitudes que se observan en las regiones codantes (exones), se extiende a la región promotora de los tres genes. Esta fuerte homología es, probablemente, la responsable de la activación conjunta de los tres genes. Es posible que la co-expresión tenga repercusiones funcionales. En nuestro laboratorio, utilizando el sistema del doble híbrido, se acaba de demostrar que la PAP I puede homodimerizar pero también heterodimerizar con la PSP I. Esto igualmente podría tener que ver con la llamativa y frecuente co-expresión.

La activación del gen de la PAP I en el hepatocarcinoma ha sido explicada por la pérdida de un factor represivo (*silencer*) en las células tumorales (Dusetti *et al.*, 1996). Este podría ser igualmente el mecanismo de activación de estos genes en el cáncer de colon. Sin embargo esto debe ser mostrado experimentalmente y quedará para futuros estudios ya que en ningún momento fue el objetivo de este trabajo de tesis.

Es interesante destacar, que una vez activados, la expresión de estos genes es fuertemente modulable por varias citoquinas y glucocorticoides. Esto sugiere que los niveles de expresión que se observan en las células tumorales, podrían ser el resultado de dos fenómenos concomitantes: por un lado la activación por pérdida de la represión y por el otro, la sobre-expresión inducida por diversos mediadores. La compleja modulación en la expresión de estos genes podría también explicar las diferencias de expresión observadas entre los diferentes pacientes. Finalmente, es importante remarcar que la irregularidad de su expresión observada en los tumores

de colon, también fue observada en los hepatocarcinomas (Lasserre *et al.*, 1992), en el colangiocarcinoma y en el cáncer de estómago (datos no mostrados). Como se describió anteriormente, el gen PAP I es activado en por lo menos, el cáncer de hígado, el colangiocarcinoma y en el cáncer de estómago, en los tres casos las células tumorales son las responsables de la expresión de la PAP I.

La función de la PAP I y de la PSP I en los tumores es desconocida. Es posible que la PSP I juegue un rol en el crecimiento de ciertos tumores. Se ha postulado que esta molécula es capaz de inducir proliferación celular de manera célula-dependiente (Zenilman *et al.*, 1996). Un rol similar se le ha adjudicado a la PAP I (Rafaeloff *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio se ha obtenido un dato de mucho interés sobre la función de la PAP y su posible relación con el cáncer. La sobre-expresión de la PAP en ciertas células aumenta su resistencia a la apoptosis inducida por varios agentes (Ortiz *et al.*, 1997). Aunque la adjudicación de estos roles en el cáncer de colon es todavía especulativa, ciertos protocolos experimentales iniciados en nuestro laboratorio confirmarán, o no, esta hipótesis en poco tiempo.

Los hallazgos de esta parte de mi trabajo fueron sorprendidos y, a pesar de que validan nuestro sistema de *screening*, abrieron más interrogantes que los que respondieron sobre la complejidad de la fisiopatogenia de la carcinogénesis en general, y del cáncer de colon en particular.

## Cdx1 y Cdx2

### INTRODUCCION

Los genes homeóticos pertenecen a una familia de factores de transcripción que contienen 183 nt (homeobox) y codifican un dominio proteico de 61 aminoácidos muy conservado (homeodominio), capaz de unirse específicamente al ADN. Fueron descubiertos por primera vez en *Drosophila* como genes que controlan la segmentación y la identidad de cada segmento (Gehring *et al.*, 1985). Aunque ya han sido clonados en muchas especies, incluyendo nematodos, xenopus, roedores y humanos, poco se sabe de la función específica de cada uno de esos genes.

Se reportó la alteración de la expresión de varios genes homeóticos en distintos tipos de cánceres (De Vita *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 1994; Tiberio *et al.*, 1994). Qin y colaboradores demostraron que la inducción de la transformación celular puede ser mediada por genes homeóticos a través de una represión transcripcional selectiva (Qin *et al.*, 1994). Actualmente, la gran cantidad de trabajos que asocian por un lado los genes homeóticos y su rol en la embriogénesis, y por el otro la diferenciación celular y el cáncer, se incrementan a un ritmo sorprendente.

En 1985, el grupo del Dr Gehring reportó el clonado del gen Cad (Caudal) en *Drosophila*, describió su secuencia homeótica y localizó su transcrito en el intestino durante la embriogénesis temprana (Mlodzik *et al.*, 1985; Mlodzik *et al.*, 1987). Más tarde, esta expresión específica fue confirmada en el ratón (Duprey *et al.*, 1988; James *et al.*, 1991), en la rata (Freund *et al.*, 1992) y en humanos (Mallo *et al.*, 1997). En mamíferos, se describieron dos genes con homología al gen Cad de *Drosophila*, se los llamó Cdx1 (por caudal-homeobox) (Duprey *et al.*, 1988; Hu *et*



*al.*, 1993) y *Cdx2* (James *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994). El patrón de expresión de los genes caudales de mamíferos resultó inusual dentro de los genes homeóticos, y sugirió un posible rol de sus proteínas en la diferenciación de los tipos celulares del epitelio intestinal (**fig 5**). Mientras que la mayoría de los genes homeóticos se expresan en tejidos derivados del mesodermo, los genes *Cdx1* y *Cdx2* se expresan en tejidos derivados del endodermo. Además, la expresión del *Cdx2* no es particular de un tipo celular. Esto sugiere, que este gen sea, probablemente, responsable del establecimiento regional de los tipos celulares, más que de la diferenciación de cada célula (James *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta que la expresión del *Cdx2* ocurre en un momento temprano en la embriogénesis y se mantiene durante el estado adulto, es natural pensar que podría estar involucrado en la formación y el establecimiento del fenotipo intestinal (Suh *et al.*, 1996). Además, por hibridación *in situ* se mostró que la expresión del *Cdx1* en el intestino de ratón comienza a los 14 días *post-coitum* (Duprey *et al.*, 1988) (el intestino primitivo comienza a desarrollarse hacia el día 8 *post-coitum*) indicando que el *Cdx1* participa en un evento tardío de la diferenciación, posiblemente durante la citodiferenciación. Finalmente, fue reportado que el gen de la sucrosa-isomaltasa, que se expresa exclusivamente en enterocitos diferenciados, es inducido por la interacción del *Cdx2* con una secuencia de su promotor (Suh *et al.*, 1996). Recientemente, se han reportado otros genes típicos del estado diferenciado del enterocito, a cuyos promotores se une el *Cdx2* y regula su expresión (Drummond *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1996).

En resumen, los genes homeóticos *Cdx1* y *Cdx2* son de un interés particular en el cáncer de colon, porque reportes previos muestran que su expresión es específica del intestino, y ha sido fuertemente sugerido un rol de esos dos genes en la inducción y/o el mantenimiento del fenotipo normal de las células intestinales.

## RESULTADOS

### Clonado del ADNc de los Cdx1 y Cdx2 humanos

Los clones 6G2 y 32D6 resultaron tener 646 y 744 nt respectivamente. Un análisis por comparación de sus secuencias, mostró que estos clones eran la contraparte humana del Cdx1 murino (Duprey *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1993), del Cdx2 murino (James *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994) y del Cdx3 de hamster (German *et al.*, 1992) respectivamente. Para completar su secuencia, realizamos un nuevo *screening* en una biblioteca de ADNc hecha a partir de ARN de colon normal, y encontramos un solo clon positivo ( $\lambda$ Cdx2a) cuando se usó como sonda el clon 32D6 y ninguno con el 6G2. El clon  $\lambda$ Cdx2a no nos aportó nucleótidos a la secuencia, entonces elegimos una estrategia basada en la RT-PCR para clonar los extremos 5' de ambos genes. Amplificamos con iniciadores específicos en las posiciones 3', e iniciadores heterólogos en 5' diseñados sobre la secuencia del Cdx1 y del Cdx2 murino y del Cdx3 de hamster respectivamente. Los productos amplificados fueron subclonados y secuenciados.

Secuencia del Cdx1: el ensamblado del clon 6G2 más el producto de PCR mostró 1695 nucleótidos sin incluir el extremo poli(A) (fig 22). Un único marco de lectura de 265 aminoácidos se reportó con un codón de inicio de la transcripción (ATG), en la posición 82, que coincide con la secuencia *consensus* propuesta por Kozak (Kozak, 1991) y con las descritas en el ratón (Duprey *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1993). La región 3' no codante se extiende desde el codón de finalización (TAG) en la posición 877 y posee una señal de poliadenilación en 1675.

Secuencia del Cdx2: la secuencia del Cdx2 se presenta en la figura 23 y muestra un marco de lectura abierto de 311 aminoácidos. La metionina de iniciación para esa proteína (en la posición 71 respecto al ARNm) concuerda con los *consensus*

propuestos por Kozak. La región 3' no codante, comienza en el TGA (codón de terminación en la posición 1004) y posee una posible señal de poliadenilación en 1722.

|  |      |
|--|------|
| aggtgagcagtcgctggtcgtcgggcgccggcagcgcggtccaggcccagcatgcgcgggggacccccgcggc              | 77   |
| caccATG TAT GTG GGC TAT GTG CTG GAC AAG GAT TCG CCC GTG TAC CCC GGC CCA GCC AGG        | 138  |
| <i>Met Tyr Val Gly Tyr Val Leu Asp Lys Asp Ser Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Arg</i>     | 19   |
| CCA GCC AGC CTC GGC CTG GGC CCG GCA AAC TAC GGC CCC CCG GCC CCG CCC CCG GCG CCC        | 198  |
| <i>Pro Ala Ser Leu Gly Leu Gly Pro Ala Asn Tyr Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro</i> | 39   |
| CCG CAG TAC CCC GAC TTC TCC AGC TAC TCT CAC GTG GAG CCG GCC CCC GCG CCC CCG ACG        | 258  |
| <i>Pro Gln Tyr Pro Asp Phe Ser Ser Tyr Ser His Val Glu Pro Ala Pro Ala Pro Pro Thr</i> | 59   |
| GCC TGG GGG GCG CCC TTC CCT GCG CCC AAG GAC GAC TGG GCC GCC GCC TAC GGC CCG GGC        | 318  |
| <i>Ala Trp Gly Ala Pro Phe Pro Ala Pro Lys Asp Asp Trp Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Gly</i> | 79   |
| CCC GCG GCC CCT GCC GCC AGC CCA GCT TCG CTG GCA TTC GGG CCC CCT CCA GAC TTT AGC        | 378  |
| <i>Pro Ala Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ala Phe Gly Pro Pro Pro Asp Phe Ser</i> | 99   |
| CCG GTG CCG GCG CCC CCT GGG CCC GGC CCG GGC CTC CTG GCG CAG CCC CTC GGG GGC CCG        | 438  |
| <i>Pro Val Pro Ala Pro Pro gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Ala Gln Pro Leu Gly Gly Pro</i> | 119  |
| GGC ACA CCG TCC TCG CCC GGA GCG CAG AGG CCG ACG CCC TAC GAG TGG ATG CCG CGC AGC        | 498  |
| <i>Gly Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Pro Thr Pro Tyr Glu Trp Met Arg Arg Ser</i> | 139  |
| GTG GCG GCC GGA GGC GGC GGT GGC AGC GGT AAG ACT CGG ACC AAG GAC AAG TAC CGC GTG        | 558  |
| <i>Val Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Thr Arg Thr Lys Asp Lys Tyr Arg Val</i>     | 159  |
| GTC TAC ACC GAC CAC CAA CGC CTG GAG CTG GAG AAG GAG TTT CAT TAC AGC CGT TAC ATC        | 618  |
| <i>Val Tyr Thr Asp His Gln Arg Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Ser Arg Tyr Ile</i> | 179  |
| ACA ATC CGG CGG AAA TCA GAG CTG GCT GCC AAT CTG GGG CTC ACT GAA CGG CAG GTG AAG        | 678  |
| <i>Thr Ile Arg Arg Lys Ser Glu Leu Ala Ala Asn Leu Gly Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys</i> | 199  |
| ATC TGG TTC CAA AAC CGG CGG GCA AAG GAG CGC AAA GTG AAC AAG AAG AAA CAG CAG CAG        | 738  |
| <i>Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Glu Arg Lys Val Asn Lys Lys Lys Gln Gln Gln</i> | 219  |
| CAA CAG CCC CCA CAG CCG CCG ATG GCC CAC GAC ATC ACG GCC ACC CCA GCC GGG CCA TCC        | 798  |
| <i>Gln Gln Pro Pro Gln Pro Pro Met Ala His Asp Ile Thr Ala Thr Pro Ala Gly Pro Ser</i> | 239  |
| CTG GGG GGC CTG TGT CCC AGC AAC ACC AGC CTC CTG GCC ACC TCC TCT CCA ATG CCT GTG        | 858  |
| <i>Leu Gly Gly Leu Cys Pro Ser Asn Thr Ser Leu Leu Ala Thr Ser Ser Pro Met Pro Val</i> | 259  |
| AAA GAG GAG TTT CTG CCA TAGccccatgccagcctgtgcccggggacctggggactcgggtgctgggagt           | 931  |
| <i>Lys Glu Glu Phe Leu Pro End</i>   | 265  |
| gtggctcctgtgggcccaggaggtctggtccgagtcctcagccctgaccttctgggacatggtggacagtcacctatcca       | 1010 |
| ccctctgcatccccttgcccattgtgtgcagtaagcctgttgataaaagaccttcagctcctgtgttctagacctt           | 1089 |
| gggggataagggagtcagggttgatgatctcaatctcccgtgggcatctcaagccccaaatggttggggagggcct           | 1168 |
| agacaaggctccagggcccacctcctcctccatcagttcagaggtgcagctggaggcctgtgtggggaccacactgatc        | 1247 |
| ctggagaaaaggatggagctgaaaaagatggaatgcttgcagagcatgacctgaggagggaggaacgtggtcaactca         | 1326 |
| cacctgcctcttctgcagcctcactctacctgccccatcataagggcactgagccctcccaggctggataactaagc          | 1405 |
| acaaagcccatagcactgggctctgatggctgctccactgggttacagaatcacagccctcatgatcattctcagtgag        | 1484 |
| ggctctggattgagagggaggccctgggaggagagaaggggacagatcttccctaccaggtttctacccccgcccag          | 1563 |
| gctgcccacagggcccaggagccccagaggactttatttcggaccaagcagagctcacagctggacaggtgtgtgat          | 1642 |
| atagagtggaatctcttgatgcagcttcaagaataaatttttcttctttcaaaaaaaaaaaaaaaaa                    | 1711 |

Figura 22: Secuencia del ARNm del Cdx1 humano y deducción de la proteína correspondiente. La secuencia de nucleótidos del ARNm fue deducida a partir del clon 6G2 y del producto clonado por RT-PCR (ver Materiales y Métodos) correspondiente al extremo 5' del ARNm del Cdx1. Los nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto para la proteína (265 aa) están representados en letra mayúscula. Las secuencias no codantes están escritas en letra cursiva normal. El sitio de poliadenilación está subrayado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

|  |                |
|--|----------------|
| gcgcccctggcagccttcaacgtcgggtccccaggcagcatggtgaggtctgctcccggaccctcgccaccATG TAC   | 76             |
|  | <i>Met Tyr</i> |
| GTG AGC TAC CTC CTG GAC AAG GAC GTG AGC ATG TAC CCT AGC TCC GTG CGC CAC TCT GGC  | 136            |
| Val Ser Tyr Leu Leu Asp Lys Asp Val Ser Met Tyr Pro Ser Ser Val Arg His Ser Gly  | 22             |
| GGC CTC AAC CTG GCG CCG CAG AAC TTC GTC AGC CCC CCG CAG TAC CCG GAC TAC GGC GGT  | 196            |
| Gly Leu Asn Leu Ala Pro Gln Asn Phe Val Ser Pro Pro Gln Tyr Pro Asp Tyr Gly Gly  | 42             |
| TAC CAC GTG GCG GCC GCA GCT GCA GCG CAG AAC TTG GAC AGC GCG CAG TCC CCG GGG CCA  | 256            |
| Tyr His Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Asn Leu Asp Ser Ala Gln Ser Pro Gly Pro  | 62             |
| TCC TGG CCG GCA GCG TAT GGC GCC CCA CTC CGG GAG GAC TGG AAT GGC TAC GCG CCC GGA  | 316            |
| Ser Trp Pro Ala Ala Tyr Gly Ala Pro Leu Arg Glu Asp Trp Asn Gly Tyr Ala Pro Gly  | 82             |
| GGC GCG GCC GCC GCC AAC GCC GTG GCT CAC GCG CTC AAC GGT GGC TCC CCG GCC GCA GCC  | 376            |
| Gly Ala Ala Ala Ala Asn Ala Val Ala His Ala Leu Asn Gly Gly Ser Pro Ala Ala Ala  | 102            |
| ATG GGC TAC AGC AGC CCC GCA GAC TAC CAT CCG CAC CAC CAC CCG CAT CAC CAC CCG CAC  | 436            |
| Met Gly Tyr Ser Ser Pro Ala Asp Tyr His Pro His His His Pro His His His Pro His  | 122            |
| CAC CCG GCC GCC GCG CCT TCC TGC GCT TCT GGG CTG CTG CAA ACG CTC AAC CCC GGC CCT  | 496            |
| His Pro Ala Ala Ala Pro Ser Cys Ala Ser Gly Leu Leu Gln Thr Leu Asn Pro Gly Pro  | 142            |
| CCT GGG CCC GCC GCC ACC GCT GCC GCC GAG CAG CTG TCT CCC GGC GGC CAG CGG CGG AAC  | 556            |
| Pro Gly Pro Ala Ala Thr Ala Ala Ala Glu Gln Leu Ser Pro Gly Gly Gln Arg Arg Asn  | 162            |
| CTG TGC GAG TGG ATG CGG AAG CCG GCG CAG CAG TCC CTC GGC AGC CAA GTG AAA ACC AGG  | 616            |
| Leu Cys Glu Trp Met Arg Lys Pro Ala Gln Gln Ser Leu Gly Ser Gln Val Lys Thr Arg  | 182            |
| ACG AAA GAC AAA TAT CGA GTG GTG TAC ACG GAC CAC CAG CGG CTG GAG CTG GAG AAG GAG  | 676            |
| Thr Lys Asp Lys Tyr Arg Val Val Tyr Thr Asp His Gln Arg Leu Glu Leu Glu Lys Glu  | 202            |
| TTT CAC TAC AGT CGC TAC ATC ACC ATC CGG AGG AAA GCC GAG CTA GCC GCC ACG CTG GGG  | 736            |
| Phe His Tyr Ser Arg Tyr Ile Thr Ile Arg Arg Lys Ala Glu Leu Ala Ala Thr Leu Gly  | 222            |
| CTC TCT GAG AGG CAG GTT AAA ATC TGG TTT CAG AAC CGC AGA GCA AAG GAG AGG AAA ATC  | 796            |
| Leu Ser Glu Arg Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Glu Arg Lys Ile  | 242            |
| AAC AAG AAG AAG TTG CAG CAG CAA CAG CAG CAG CAG CCA CCA CAG CCG CCT CCG CCG CCA  | 856            |
| Asn Lys Lys Lys Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro  | 262            |
| CCA CAG CCT CCC CAG CCT CAG CCA GGT CCT CTG AGA AGT GTC CCA GAG CCC TTG AGT CCG  | 916            |
| Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Ser Val Pro Glu Pro Leu Ser Pro  | 282            |
| GTG TCT TCC CTG CAA GCC TCA GTG TCT GGC TCT GTC CCT GGG GTT CTG GGG CCA ACT GGG  | 976            |
| Val Ser Ser Leu Gln Ala Ser Val Ser Gly Ser Val Pro Gly Val Leu Gly Pro Thr Gly  | 302            |
| GGG GTG CTA AAC CCC ACC GTC ACC CAG TGAcccaccgggggtctgcagcggcagagcaattccaggctgag | 1046           |
| Gly Val Leu Asn Pro Thr Val Thr Gln End  | 311            |
| ccatgaggagcgtggactctgctagactcctcaggagagaccctcccctcccaccacagccatagacctacagacct    | 1125           |
| ggctctcagaggaaaaatgggagccaggagtaagacaagtgggatttggggcctcaagaataatactctcccagatttt  | 1204           |
| tacttttccatctggctttttctgccactgaggagacagaaaagcctccgctgggcttcattccggactggcagaagca  | 1283           |
| ttgctggactgaccacaccaaccagcttcatctatccgactcttctcttctctagatctgcaggctgcacctctggcta  | 1362           |
| gagccgaggggagagaggactcaagggaaaggcaagcttgaggccaagatggctgctgctgctcatggccctcggag    | 1441           |
| gtccagctggcctcctgctccgggagcaaggtttactctggaacgcaaaaggcagctaagatagaaaagctggact     | 1520           |
| gacaaaagactgcagaacccccagggtggccctgcgtctttttctcttcccttcccagaccaggaaaggcttggctgg   | 1599           |
| tgtatgcacagggtgtggtatgaggggtgggtattggactccaggcctgaccagggggcccgaacaggacttgttaga   | 1678           |
| gagcctgtcaccagagcttctctgggctgaatgtatgtcagtgctataaaatgccagagccaacctgaaaaaa        | 1751           |

**Figura 23:** Secuencia del ARNm del Cdx2 humano y deducción de la proteína correspondiente. La secuencia de nucleótidos del ARNm fue deducida a partir del clon 32D6, del clon  $\lambda$ Cdx2a y del producto clonado por RT-PCR (ver Materiales y Métodos) correspondiente al extremo 5' del ARNm del Cdx2. Los nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto para la proteína (311 aa) están representados en letra mayúscula. Las secuencias no codantes están escritas en letra cursiva normal. El sitio de poliadenilación está subrayado.

### **Análisis de la secuencia de las proteínas del Cdx1 y Cdx2**

Cuando se compararon las secuencias proteicas de los dos homebox humanos, se observó poca homología fuera de la secuencia correspondiente al homeodominio, excepto para el tetrapéptido EWMR, el hexapéptido PPQYPD, los 10 aa N-terminales y la secuencia rica en glutamina (Q) que sigue al homeodominio, tal como se había descrito en las secuencias de roedores.

En la **figura 24** se comparan las secuencias proteicas Cdx1 humana y de ratón que muestran un 85% de homología. Aunque todos los aminoácidos del homeodominio fueron perfectamente conservados, la región C-terminal resultó ser sólo un 60% homóloga. El alineamiento entre la secuencia correspondiente al Cdx2 humano y de ratón mostró la misma homología que cuando se compara la secuencia humana con el Cdx3 de hamster (94%). Los homeodominios humano y de hamster mostraron identidad total, mientras que 3 diferencias se observaron entre los Cdx2 humano y de ratón (**fig 25**). Al igual que para el Cdx1, la secuencia de los Cdx2 y Cdx3 analizadas se mostró menos conservada en la región C-terminal. El alto grado de homología entre los tres Cdx estudiados (Cdx2 humano, Cdx2 de ratón y Cdx2 de hamster), permite sugerir que la secuencia del Cdx3 corresponde a la versión de hamster homóloga al Cdx2, como fue sugerido anteriormente por Suh *et al.*, (1994).

### **Estudio de la expresión del Cdx1 y Cdx2**

La expresión de los genes Cdx1 y Cdx2 fue estudiada por Northern *blot* en adenocarcinomas de colon, provenientes de doce pacientes y su correspondiente mucosa normal (**fig 26**). Una sola banda de 2.0 kb hibridó con la sonda que corresponde al extremo 3' no codante del Cdx1 y una banda de 1.9 kb se observó cuando la sonda utilizada, correspondía al extremo 3' no codante del Cdx2.

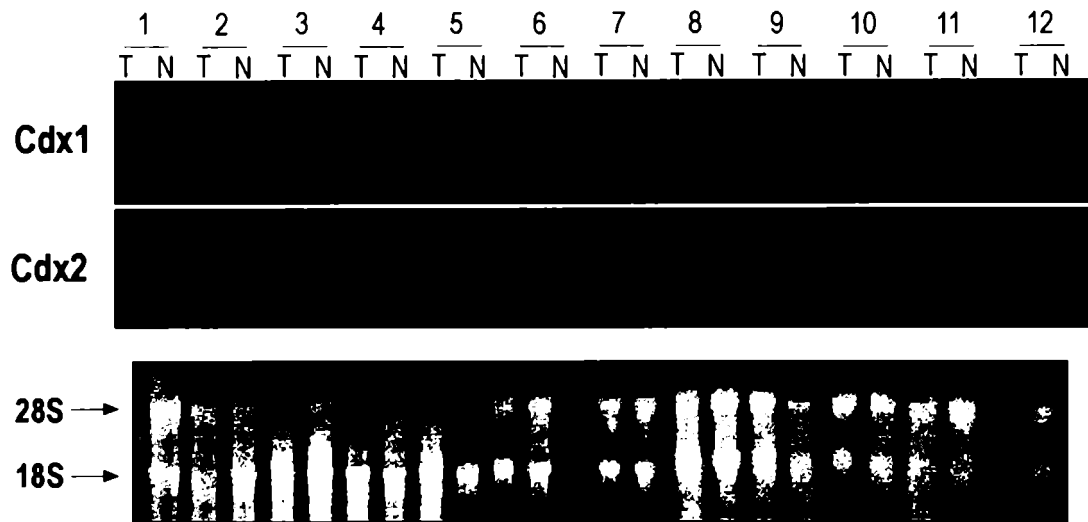
|         |             |          |        |        |      |    |    |    |    |       |     |     |     |     |
|---------|-------------|----------|--------|--------|------|----|----|----|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| HumCdx1 | MYVGYVLDKDS | PVYGGPAR | PA     | SLGLG  | PAN  | Y  | PP | AP | PP | APPQY | PDF | SS  | YSH | 50  |
| RoeCdx1 | MYVGYVLDKDS | PVYGGPAR | PS     | SLGLG  | PPT  | Y  | AP | PP | AP | APPQY | PDF | AGY | TH  | 50  |
| HumCdx1 | VEPAPAPP    | TAWG     | APFPAP | KDDWAA | AYGG | PP | AA | PA | AS | PA    | S   | L   | A   | 100 |
| RoeCdx1 | VEPAPAPP    | PTWA     | APFPAP | KDDWAA | AYGG | PT | AS | AA | SP | AP    | L   | A   | F   | 100 |
| HumCdx1 | VPAPPGPG    | GLLAQ    | PLG    | GP     | TP   | SS | PG | AQ | RP | TP    | Y   | E   | W   | 150 |
| RoeCdx1 | VPAPPGPG    | GLLAQ    | SLG    | AP     | GA   | P  | R  | R  | TP | Y     | E   | W   | W   | 150 |
| HumCdx1 | TRTKDKYR    | VVYTDH   | QRLE   | LEKE   | FHYS | RY | T  | I  | RR | K     | S   | E   | L   | 200 |
| RoeCdx1 | TRTKDKYR    | VVYTDH   | QRLE   | LEKE   | FHYS | RY | T  | I  | RR | K     | S   | E   | L   | 200 |
| HumCdx1 | WFQNRRAK    | E        | K      | V      | N    | K  | K  | Q  | Q  | Q     | Q   | P   | P   | 247 |
| RoeCdx1 | WFQNRRAK    | E        | K      | V      | N    | K  | K  | Q  | Q  | Q     | Q   | P   | L   | 250 |
| HumCdx1 | T           | S        | L      | L      | A    | T  | S  | S  | P  | M     | P   | V   | K   | 265 |
| RoeCdx1 | A           | G        | L      | L      | G    | T  | P  | S  | P  | V     | P   | V   | K   | 268 |

Figura 24: Homología entre los Cdx1 humano y de ratón. Las secuencias de los Cdx1 humanos y de ratón han sido alineadas. Las áreas recuadradas corresponden a aminoácidos idénticos y el homeodominio es mostrado en negrilla.

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| HumCdx2   | M Y V S Y L L D K D V S M Y P S S V R H S G G L N L A P Q N F V S P P C Y P D Y G G Y I I V A A A A A   | 50  |
| RatónCdx2 | M Y V S Y L L D K D V S M Y P S S V R H S G G L N L A P Q N F V S P P C Y P D Y G G Y H V A A A A A A   | 50  |
| HamsCdx3  | M Y V S Y L L D K D V S M Y P S S V R H S G G L N L A P Q N F V S P P C Y P D Y G G Y H V A A A A A A   | 50  |
| HumCdx2   | A Q N L D S A Q S P G P S W P A A Y G A P L R E D W N G Y A P G G A P A A N A V A H A L N G G S P       | 99  |
| RatónCdx2 | A T A N L D S A Q S P G P S W P T A Y G A P L R E D W N G Y A P G G A P A A N A V A H G L N G G S P     | 100 |
| HamsCdx3  | A A A N L D S A Q S P G P S W S T A Y G A P L R E D W N G Y P P G G A P A A N A V A H G L N G G S P     | 100 |
| HumCdx2   | A A A M G Y S S P A D Y H P H H P H H P H P A A P S C A S G L L Q T L N P G P P G P A A T A             | 149 |
| RatónCdx2 | A A A M G Y S S P A E Y H A H H P H H P H H P A A S P S C A S G L L Q T L N L G P P G P A A T A         | 150 |
| HamsCdx3  | A A A M G Y S S P A D Y H A H H P H H P H H P A A A P S C A S G L L Q T L N P G P P G P A A T G         | 150 |
| HumCdx2   | A A E Q L S P G G Q R R N L C E W M R K P A Q Q S L G S Q V K T R T K C K Y R V V Y T D H Q R L E L     | 199 |
| RatónCdx2 | A A E Q L S P S G Q R R N L C E W M R K P A Q Q S L G S Q V K T R T K C K Y R V V Y T D H Q R L E L     | 200 |
| HamsCdx3  | A A E Q L S P S G Q R R N L C E W M R K P A Q P S L G S Q V K T R T K C K Y R V V Y T D H Q R L E L     | 200 |
| HumCdx2   | E K E F H Y S R Y I T I R R K A E L A A T L G L S E R Q V K I W F Q N R R A K E R K I N K K K L Q       | 248 |
| RatónCdx2 | E K E F H F S R Y I T I R R K S E L A A T L G L S E R Q V K I W F Q N R R A K E R K I K K K . . Q Q     | 248 |
| HamsCdx3  | E K E F H Y S R Y I T I R R K A E L A A T L G L S E R Q V K I W F Q N R R A K E R K I N K K K L Q Q     | 250 |
| HumCdx2   | Q Q Q Q Q P P Q P P P P P Q P P Q P Q P Q P P L R S V P E P L S P V S L Q A S V S G S V P G V L         | 298 |
| RatónCdx2 | Q Q Q Q Q Q Q Q Q P P Q P P P P P Q P S Q P Q P G A L R S V P E P L S P V S L Q G S V P P G S V P G V L | 298 |
| HamsCdx3  | Q Q Q Q Q Q Q Q Q L A S P P P Q P S Q P Q P G S L R S V P E P L S P V S L Q G S V P P G S V P G V L     | 300 |
| HumCdx2   | G P T G G V L N P T V T Q   | 311 |
| RatónCdx2 | G P A G G V L N S T V T Q   | 311 |
| HamsCdx3  | G P A G G V L N P T V T Q   | 313 |

Figura 25: Homología entre los Cdx2 humano y de ratón, y Cdx3 de hamster. Las secuencias de las tres proteínas han sido alineadas. Las áreas recuadradas corresponden a aminoácidos idénticos y el homeodominio es mostrado en negrilla.

En todos los pacientes en los que se observó una modificación, ésta consistió en una reducción o ausencia de la expresión en tejido neoplásico respecto del normal. Esta disminución fue proporcional para los dos Cdx, sin embargo los pacientes 4 y 7 no muestran ninguna diferencia en la expresión de ambos transcritos en las dos condiciones estudiadas.



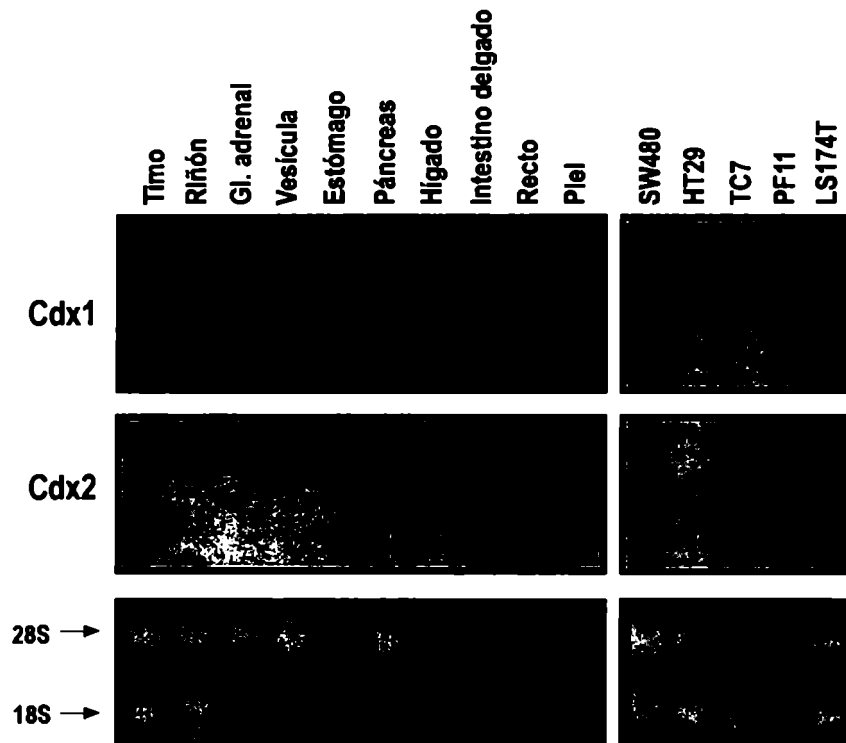
**Figura 26:** Expresión del Cdx1 y del Cdx2 humanos en el carcinoma colorectal. Análisis por Northern blot usando 20 µg de ARN de tumor de colon (T) y su mucosa normal adyacente (N). Los pacientes (n=12), son identificados arriba de la figura. Las sondas ( $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP) fueron preparadas a partir de los insertos 6G2 (Cdx1) y 32D6 (Cdx2) por *random priming*. La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis de los ARNr 28S y 18S coloreados con bromuro de etidio. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 72 hs.

Para estudiar la distribución tisular del Cdx1 y del Cdx2, el ARN de distintos tejidos humanos fue aislado y analizado por Northern blot, con sondas radioactivas preparadas a partir de los clones 6G2 y 32D6 respectivamente. Ambos transcritos se expresan en intestino delgado, colon y recto, pero no fueron detectados en otros tejidos como por ejemplo timo, riñón, glándula adrenal, vesícula biliar, estómago, páncreas, hígado y piel (**fig 26 y fig 27**). Esta distribución restringida concuerda con la bibliografía previamente reportada para el Cdx1 y Cdx2 murinos (Duprey *et*



*al.*, 1988; Hu *et al.*, 1993; Suh *et al.*, 1994; James *et al.*, 1991), y para el Cdx1 de rata (Freund *et al.*, 1992).

Finalmente se estudió la expresión de los dos genes homeóticos en cinco líneas celulares derivadas de carcinomas colorectales. Se encontró, que el transcripto del Cdx1 fue detectado en LS174T, mientras que el del Cdx2 fue encontrado en las células SW480, TC7, PF11. Ninguno de los transcriptos fue detectado en la línea HT29 (fig 27) después de 3 días de exposición.



**Figura 27:** Expresión de Cdx1 y Cdx2 en diversos tejidos humanos. La distribución de los ARNm correspondientes al Cdx1 y al Cdx2, fue realizada por Northern blot sobre ARN total (20 µg) extraído de varios tejidos y de cinco líneas celulares derivadas de colon. Las sondas ( $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) fueron preparadas a partir de los insertos 6G2 (Cdx1) y 32D6 (Cdx2), por *random priming*. La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis de los ARNr 28S y 18S coloreados con bromuro de etidio. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^\circ\text{C}$  por 72 hs.

## *DISCUSION*

La transformación de una célula y la adquisición de un fenotipo invasivo y metastático es el resultado de la activación de un proceso celular complejo, más que del efecto de la activación o represión de un solo gen. Sin embargo, es probable que la coordinación de múltiples genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad actúen bajo el control de unos pocos genes "maestros". Estos genes podrían funcionar como factores de transcripción activando el programa que lleva hacia la invasión celular y a la metástasis. Es entonces tentador identificar esos factores de transcripción para entender las bases moleculares de la neoplasia. Considerando los datos bibliográficos existentes, los miembros de la familia Cdx parecieran jugar un rol importante, en el establecimiento del fenotipo intestinal durante el desarrollo, y en el mantenimiento de este fenotipo en el adulto, a través de la activación de genes del "estado diferenciado".

Nosotros describimos, que 10 de 12 pacientes con cáncer de colon mostraron una reducción o una ausencia en la expresión del Cdx1 y Cdx2, mientras que los dos pacientes restantes no mostraron diferencias con respecto al tejido normal (**fig 26**). Investigamos si existía una relación respecto al grado de displasia o al estado clínico del tumor y encontramos una relación inversa (dato no mostrado). Esto podría querer decir que cuanto menor es la expresión de los transcritos en el tejido maligno, peor es el pronóstico. El número de casos estudiados es pequeño para llegar a una conclusión definitiva, pero nos permite sugerir que una disminución en la expresión de los Cdx está asociada con la progresión de estados más avanzados del cáncer de colon. También es posible que la alteración en la expresión de estos genes homeóticos sea una consecuencia de la desregulación que ocurre durante la progresión del tumor. No se conoce mucho sobre los genes

que serían regulados por la gran familia de genes homeóticos, pero algunos reportes indican que, entre otras cosas, ellos regulan la expresión de moléculas de adhesión (Edelman *et al.*, 1992; Walsh *et al.*, 1993). Por lo tanto, uno podría especular con que la expresión anormal de estos genes permitiría la dispersión de células tumorales a lugares distantes dentro del organismo.

En la **figura 26** mostramos que la expresión de los dos Cdx es coordinada en el cáncer de colon lo que sugiere un mecanismo de regulación común. Sin embargo, la expresión en las líneas celulares mostró que en cuatro de ellas (LS174T, PF11, TC7 y SW480) la expresión no fue coordinada, aunque los genes de los dos Cdx estaban presentes en el genoma de todas las líneas estudiadas, cuando se los analizó por PCR (dato no mostrado). Esto indicaría, que la coordinación de la expresión de los dos genes se produce por mecanismos diferentes.

Algunos estudios compararon la expresión de genes homeóticos en el tejido neoplásico y normal. Por ejemplo se halló que el HOXC-6 se expresa en la glándula mamaria de ratón, pero a niveles bajos en el tejido pre-canceroso y está ausente en el cáncer (Friedman *et al.*, 1994). Tiberio y colaboradores, describieron que la sub-expresión de los genes HOX juega un rol en la progresión del cáncer de pulmón, posiblemente a través de la alteración en su actividad supresora de tumor (Tiberio *et al.*, 1994). Sin embargo, no todos los genes homeóticos están sub-expresados durante la carcinogénesis, otros al contrario están sobre-expresados o no se modifican (Barba *et al.*, 1993). La expresión de HOX en el cáncer de colon no mostró diferencias cuantitativas con el tejido normal, aunque los HOX2C y HOX4B mostraron alteraciones en el tamaño de sus transcritos, debido, probablemente, a *splicings* alternativos (De Vita *et al.*, 1993).

Los cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de muchos homeobox, aunque no en todos, sugieren que ellos podrían participar en la carcinogénesis

como genes supresores (si se sub-expresan) o como oncógenos (si están sobre-expresados). Siguiendo este principio uno podría especular con que los genes Cdx1 y Cdx2 actuarían en el intestino como dos genes supresores potenciales.

## Estudio de la función del Cdx1 y Cdx2 en el cáncer de colon

### *INTRODUCCION*

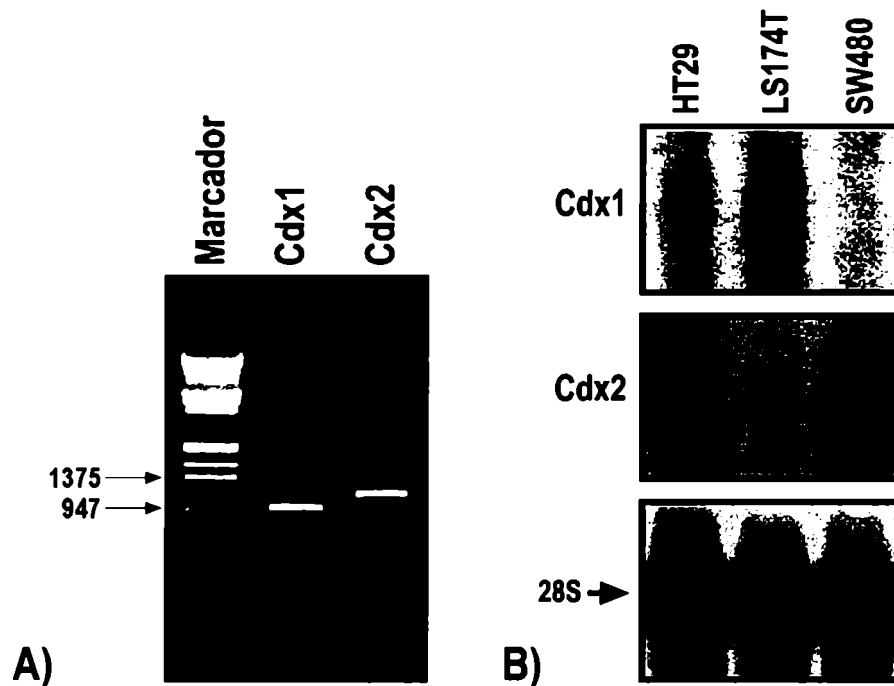
Entre los clones analizados nos pareció interesante profundizar el estudio sobre los dos genes homeóticos (Cdx1 y Cdx2). El hecho de ser factores de transcripción involucrados durante el desarrollo, su tejido-especificidad (cosa inusual dentro de los genes homeóticos) y la sub-regulación, proporcional al estado de la enfermedad, nos llevó a suponer un rol importante para estos genes en la progresión del cáncer de colon. Es por eso, que nos decidimos a desarrollar un sistema *in vitro*, a fin de poder estudiar la función de estas moléculas en relación al cáncer colorectal.

### *RESULTADOS*

#### **Expresión endógena del Cdx1 y Cdx2 en células HT29**

Durante el clonado y el estudio de la expresión de los Cdx1 y Cdx2 humanos, encontramos que la línea celular humana de colon HT29, no expresaba ni el Cdx1 ni el Cdx2 en cantidades detectables por Northern *blot* (ver **fig 27**). Para confirmar estos resultados decidimos realizar una RT-PCR (**fig 28a**). Los resultados nos mostraron un nivel bajo de expresión de ambos Cdxs, pero detectable por RT-PCR o por exposiciones prolongadas de las autoradiografías (**fig 28b**). Una línea celular que expresa niveles bajos de un determinado transcripto, es un buen modelo para estudiar la sub y la sobre-expresión de dicho transcripto. Nosotros estudiamos la

sobre-expresión transfectando las células con un plásmido que contiene la secuencia del ADNc, y la sub-expresión por transfección con un plásmido que posee la secuencia anti-sense.

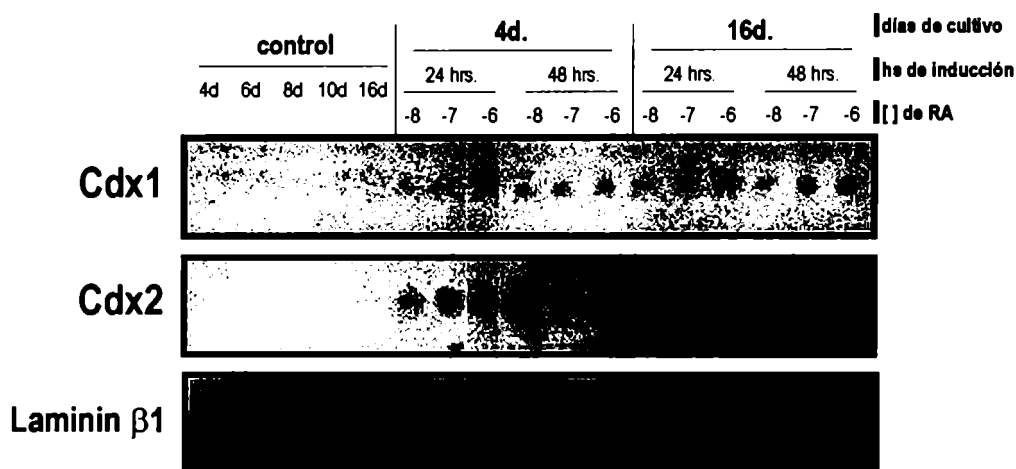


**Figura 28:** Identificación del Cdx1 y Cdx2 en HT29. **A)** por RT-PCR a partir de iniciadores específicos. En la figura se observa una amplificación selectiva del Cdx1 (942 nt) y del Cdx2 (1048 nt), de acuerdo a lo esperado (ver Materiales y Métodos). La coloración del gel fue realizada con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular corresponde a una restricción (EcoRI/HindIII) en el ADN del fago  $\lambda$ . **B)** por Northern blot a partir de 20  $\mu$ g de ARN de las células HT29, LS174T y SW480. Las sondas ( $\alpha$ [ $^{32}$ P]dCTP) fueron preparadas a partir de los insertos 6G2 (Cdx1) y 32D6 (Cdx2), por *random priming*. La cantidad de ARN depositada sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNr 28S. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 hs. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 10 días.

### Inducción por ácido retinoico

El RA (*Retinoic Acid*) es un derivado de la vitamina A, esencial para el desarrollo normal del embrión y la viabilidad de los vertebrados. Existen dos tipos de receptores conocidos para el RA, los RAR (*Retinoic Acid Receptor*) y los RXR (*Retinoid X Receptor*) y cada una de las familias está compuesta por tres genes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Son conocidos los efectos del RA endógeno sobre el desarrollo embrionario

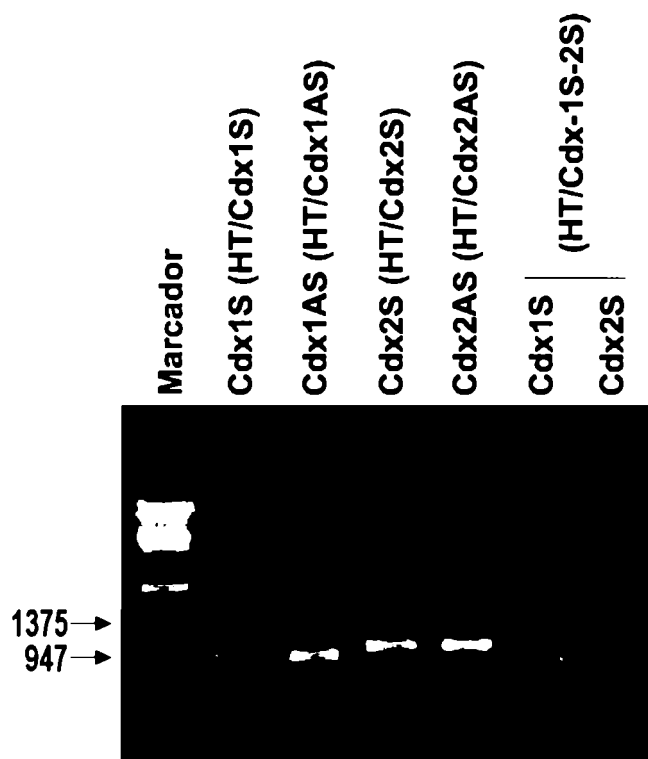
(López *et al.*, 1995; Avantaggiato *et al.*, 1996) y sobre la alteración en la expresión de genes, en particular los del tipo homeóticos (López *et al.*, 1995; Ogura *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1995; Bouillet *et al.*, 1995). Por ello, nos interesó conocer si el RA era capaz de estimular la expresión del Cdx1 y Cdx2 en las células de colon HT29. Se observa una inducción bien pronunciada para el Cdx2 en las células incubadas por 16 días. También, se ve una respuesta dosis-dependiente para el RA, sobre todo con inducciones de 48 hs. El Cdx1 muestra el mismo patrón de inducción que el Cdx2 (fig 29).



**Figura 29:** Inducción del Cdx1 y del Cdx2 humanos por el RA en células HT29. Análisis por Northern blot usando 20 µg de ARN de HT29 cultivadas 4, 6, 8, 10 o 16 días en condiciones normales (controles). Las inducciones con RA se realizaron durante 24 o 48 hs. (en células cultivadas durante 4 o 16 días) y a tres concentraciones diferentes ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M). Las sondas ( $\alpha[^{32}P]$ dCTP) fueron preparadas a partir de los insertos 6G2 (Cdx1) y 32D6 (Cdx2) por *random priming*. La cantidad de ARN depositado sobre las membranas fue controlada por análisis del ARNm para la Laminin β1. Las autorradiografías fueron expuestas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 96 hs.

**Estudio de la expresión de Cdx1S, Cdx2S, Cdx1AS, Cdx2AS, Cdx-1S-2S y CAT en células HT29 transfectadas**

Para estudiar las células recombinantes, después de la selección con antibiótico, más de 100 colonias independientes fueron mezcladas (por cada transfección), crecidas a confluencia, disociadas, alicuotadas y guardadas en Nitrógeno líquido. Una vez descongeladas, las células fueron usadas hasta un máximo de seis pasajes y crecidas permanentemente en presencia de antibiótico, excepto durante el curso de los experimentos en los que no se usó ninguna selección. Para verificar si las células expresaban los genes transfectados, diseñamos una estrategia basada en RT-PCR. Amplificamos el extremo 5', con iniciadores específicos de los clones transfectados y el extremo 3', con oligos diseñados sobre la región que precede la señal de poliadenilación de los vectores correspondientes.



**Figura 30:** Identificación de los Cdx1S, Cdx1AS, Cdx2S, Cdx2AS y Cdx-1S-2S exógenos en HT29 por RT-PCR con iniciadores específicos. En la figura se observa una amplificación selectiva del Cdx1S y Cdx1AS (994 nt) con las células HT/Cdx1S y HT/Cdx1AS, del Cdx2S y Cdx2AS (1101 nt) con las células HT/Cdx2S y HT/Cdx2AS y Cdx1S (994 nt) y Cdx2S (1129 nt) con las células HT/Cdx-1S-2S de acuerdo a lo esperado (ver Mat y Mét). La coloración del gel fue realizada con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular corresponde a una restricción (EcoRI/HindIII) en el ADN del fago λ.

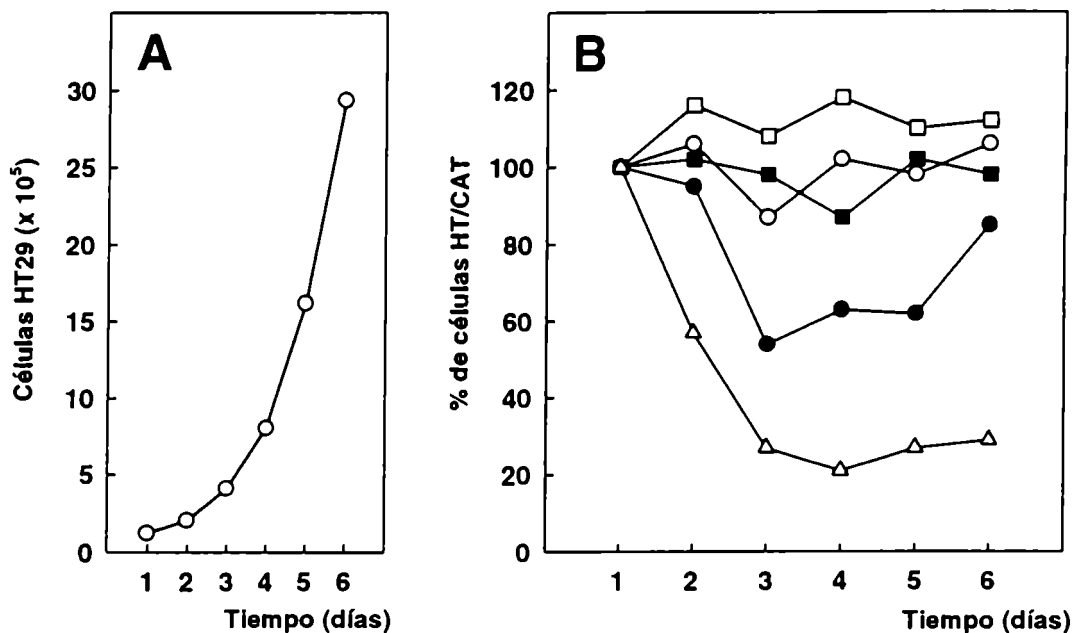


Los resultados mostrados en la **figura 30** indican que cada célula transfectada expresa su correspondiente transcrito. Las células HT/CAT fueron verificadas controlando su actividad CAT en extractos celulares (vease Materiales y Métodos).

**Estudio del crecimiento de HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS, HT/Cdx-1S-2S y HT/CAT**

Teniendo en cuenta, que el crecimiento es uno de los primeros parámetros alterados en la progresión del cáncer, nos pareció oportuno estudiar si éste se alteraba como consecuencia de la expresión de los Cdx en nuestro sistema.

La curva de crecimiento de cada línea celular transfectada es mostrada en la **figura 31b**. Resultados similares fueron obtenidos, cuando las células fueron contadas o cuando la cantidad fue estimada por MTT.



**Figura 31:** Estudio del crecimiento en células HT29 transfectadas. (A) células HT29 parentales (partiendo de  $5.10^3$  células. (B) Cinética de crecimiento de: HT/Cdx1S (■), HT/Cdx1AS (□), HT/Cdx2S (●), HT/Cdx2AS (○) y HT/Cdx1S2S (Δ). Los valores fueron expresados como un porcentaje de las células al día 1 y relativo al crecimiento de las células HT/CAT. Los resultados son representativos de un experimento. Las células fueron contadas en un Hemacytometer después de una coloración con Trypan blue.

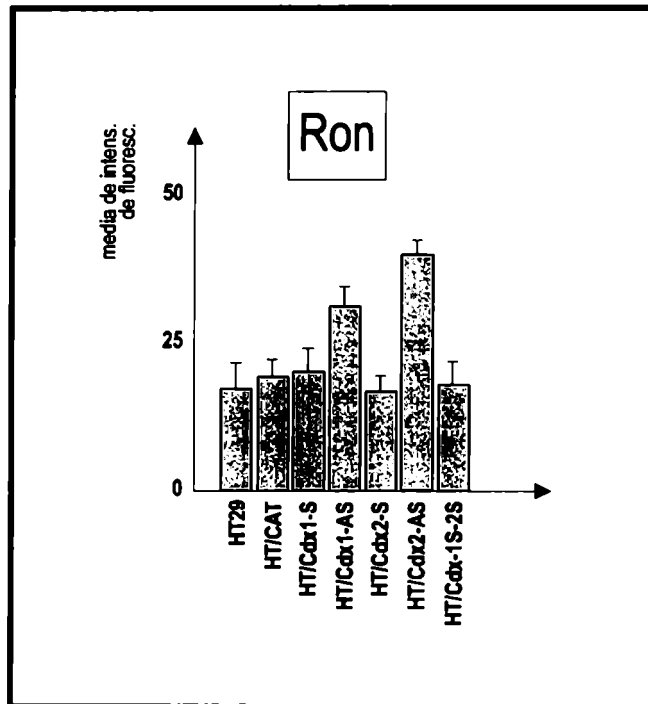
Las células transfectadas con CAT (HT/CAT) fueron elegidas como control, ya que fueron sometidas a las mismas condiciones de cultivo (transfección y selección), que las células transfectadas con las distintas construcciones de ambos Cdx, pero expresan una proteína no relevante. De hecho, aunque HT/CAT fue utilizada como control en los experimentos, no mostró diferencias con la célula parental (HT29), sugiriendo, si existe, un mínimo efecto de la transfección y de la selección (dato no mostrado).

El tiempo de duplicación para la transfección HT/CAT fue de aproximadamente 24 hs bajo nuestras condiciones de cultivo, como se ve en la **figura 31a**. HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS, quienes sobre-expresan el Cdx1 o bloquean la expresión del Cdx1 y Cdx2 respectivamente, crecen como las células controles. La línea HT/Cdx2S crece menos (aproximadamente 55% respecto al control). Notablemente, la transfección HT/Cdx-1S-2S crece significativamente menos (aproximadamente 20% respecto al control). Estos resultados, sugieren que la sobre-expresión del Cdx2 es capaz de inhibir parcialmente el crecimiento celular. Pero, sorpresivamente, la sobre-expresión simultánea del Cdx1 (que no tiene efecto cuando es sobre-expresado solo), potencializa de manera significativa el efecto del Cdx2.

### **Aumento de la expresión del Ron en HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS**

El Ron es un receptor heterodimérico del tipo tirosin-kinasa, activado por el HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) y su homólogo el MSP (*Macrophage Stimulating Protein*). La activación del Ron no produce transformación, pero su estimulación produce crecimiento invasivo (Santoro *et al.*, 1996). Mientras el tumor de colon progresa, la expresión de los Cdx1 y Cdx2 disminuye. Por esto, nos interesó conocer si la expresión del Ron podía estar regulada por esos genes homeóticos.

En la **figura 32** se puede observar una expresión basal del Ron en la línea HT29 parental. Nosotros estudiamos si la manipulación de la expresión de los Cdx1 y Cdx2 en esas células, era capaz de modificar los niveles del Ron. Dichos niveles fueron analizados por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal. En la misma figura se muestra que no existen diferencias entre HT/Cdx1S, HT/Cdx2S y HT/Cdx-1S-2S y tampoco entre los controles HT/CAT y HT29. Sin embargo, en las células en las que la expresión del Cdx1 y del Cdx2 están bloqueadas, los niveles del Ron se incrementan un 84 y un 130% respectivamente. Esto sugiere que los genes Cdx1 y Cdx2 actúan como represores de la expresión del Ron.



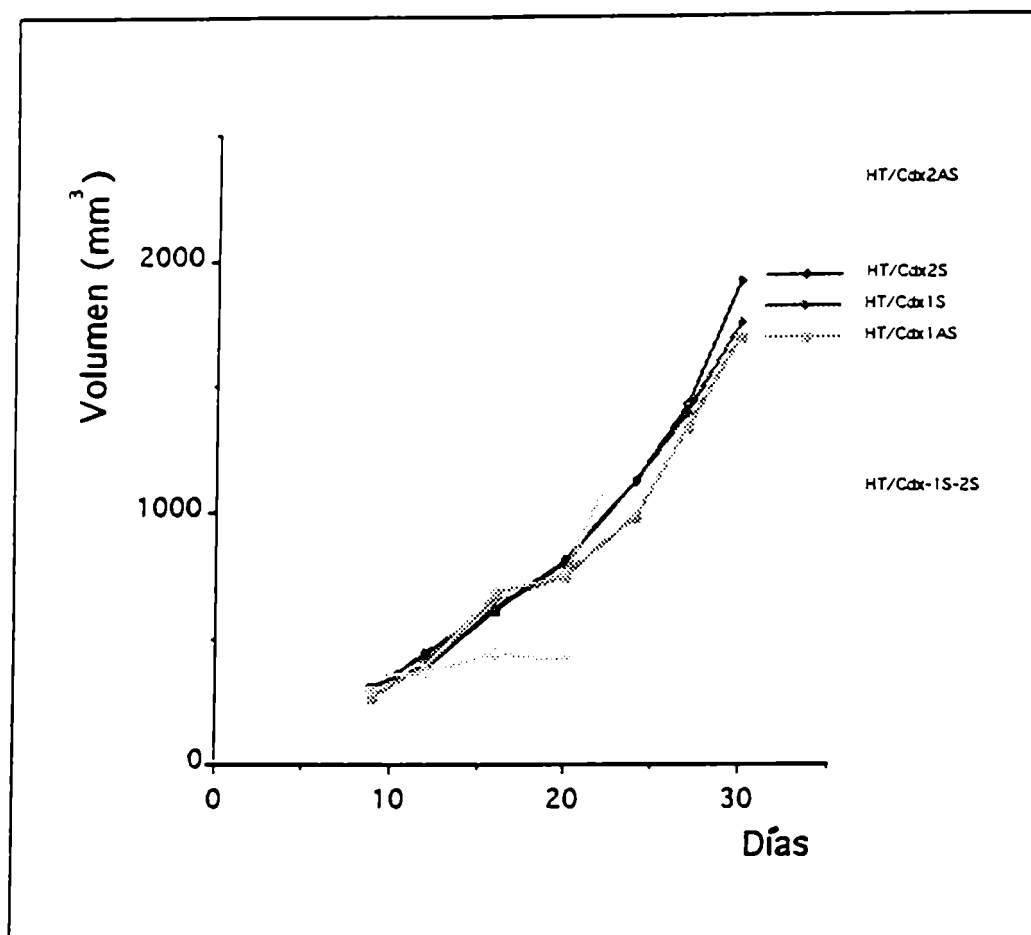
**Figura 32:** Análisis de la expresión del receptor Ron por citometría de flujo en las células HT29 transformadas con un anticuerpo monoclonal (clon ID-2).

### **Efecto anti-tumoral de la expresión de los genes Cdx *in vivo***

Existen numerosos factores *in vivo*, que pueden influenciar la progresión tumoral y que no son controlables en un experimento *in vitro*. Por esta razón, nos pareció

interesante estudiar el crecimiento *in vivo* utilizando un modelo animal, los ratones inmunodeprimidos NUDE. Este modelo permite determinar el efecto global de la sub- o de la sobre-expresión de los genes Cdx1 y Cdx2, en las células HT29 durante el desarrollo del tumor. Reportes recientes mostraron que la inyección subcutánea de las células HT29, no da lugar a la formación de metástasis (de Vries *et al.*, 1995) utilizando este sistema de inoculación. Este sistema es entonces apto para el estudio del crecimiento tumoral, pero no para evaluar la capacidad anti o pro metastática.

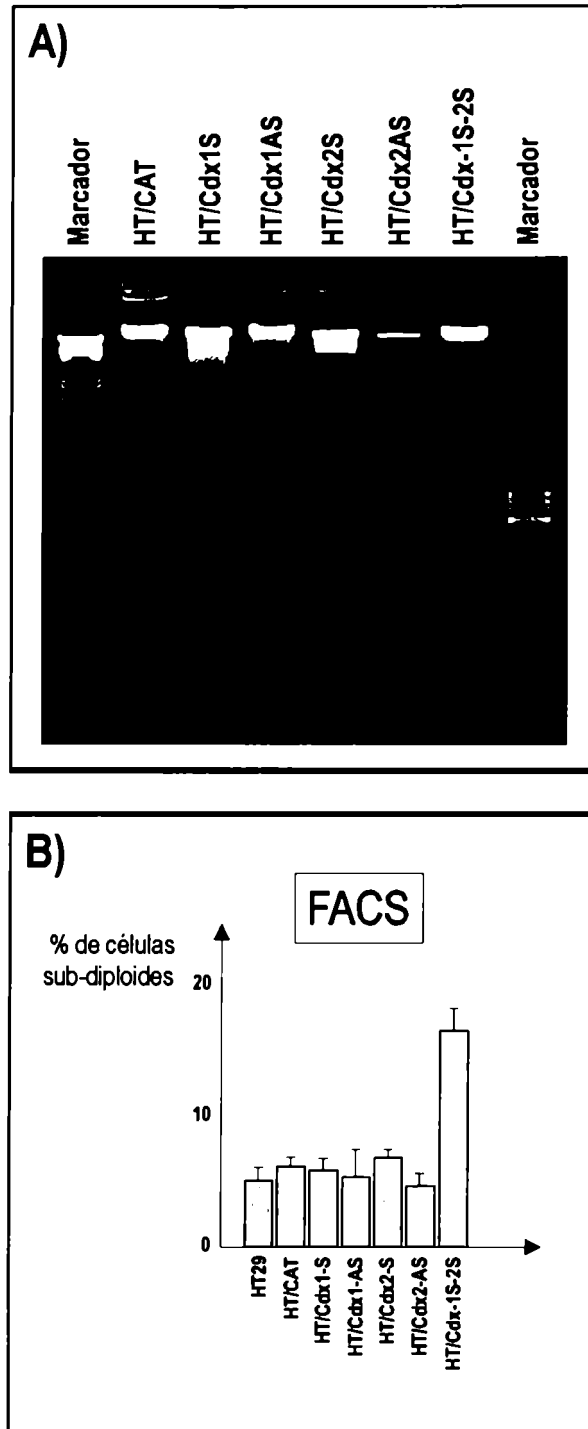
Las células HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S inyectadas subcutáneamente generaron diversos tipos de tumores. El promedio del volumen de los tumores de cinco ratones por cada tipo celular, determinado cada tres días, permitió calcular la evolución de cada tumor (fig 33). Los resultados descriptos sobre los tumores derivados de las células HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, son comparables a aquellos encontrados en los tumores derivados de las células control HT/CAT (dato no incluido en la figura para simplificar la comprensión). Este no es el caso de los tumores derivados de las células HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S. Los tumores compuestos de células HT/Cdx2AS mostraron un crecimiento netamente superior que el de los controles. En cambio, el crecimiento de los tumores de las células HT/Cdx-1S-2S fue francamente inhibido. La represión de la expresión endógena de Cdx2 en las células HT29 (HT/Cdx2AS), aporta un importante potencial proliferativo; por el contrario, la sub-expresión conjunta del Cdx1 y Cdx2 inhibe drásticamente el desarrollo del tumor.



**Figura 33:** Efecto tumoral de las células HT29 transfectadas in vivo en ratones NUDE. Las curvas representan el promedio del volumen de cinco tumores por cada tipo de célula transfectada (HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S).

#### **Resistencia de las células HT29-transfectadas a la inducción de apoptosis por privación de suero**

Las células tumorales se caracterizan por un crecimiento desmedido, asociado a una pérdida en la capacidad de morir. Por esto nos interesó saber si la sobreexpresión de los Cdx1 y Cdx2 incrementaba la sensibilidad a la apoptosis en células tumorales. Para analizarlo, se indujo apoptosis por privación de suero durante 96 hs. Se controló la capacidad de entrar en apoptosis estudiando la fragmentación del ADN genómico en geles de agarosa (**fig 34a**).



**Figura 34:** Estudio de la sensibilidad de las células HT29 transfectadas (HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S) y la línea parental HT29 a la inducción de la apoptosis por privación de suero. **A)** ADN genómico migrado en geles de agarosa 1% y teñido con bromuro de etidio (marcador de alto peso molecular:  $\lambda$ Eco RI/Hind III; marcador de bajo peso molecular: pBR322/Hae III). **B)** por citometría de flujo (FACS) estimando el porcentaje de células sub-diploides después del teñido con yoduro de propidio.

Posteriormente cuantificamos la degradación del ADN por citometría de flujo o FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) después del teñido con yoduro de propidio. Cuando las células HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS, HT/Cdx-1S-2S y HT/CAT o HT29 control fueron crecidas en presencia de suero, menos del 1% mostraron el perfil correspondiente a células apoptóticas (dato no mostrado). Sin embargo cuando las células fueron privadas de suero por 96 hs, las células HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/CAT o HT29 tuvieron un moderado aumento de la apoptosis (entre 5 y 7%), mientras que las células HT/Cdx-1S-2S mostraron un incremento mayor (16%) (**fig 34b**).

Esto sugiere que la expresión conjunta de ambos genes (Cdx1 y Cdx2), incrementa la sensibilidad a la apoptosis, cosa que no ocurre cuando cada Cdx es sobre-expresado independientemente. Resultados comparables a los descritos fueron observados cuando la apoptosis fue cuantificada por TUNEL (dato no mostrado).

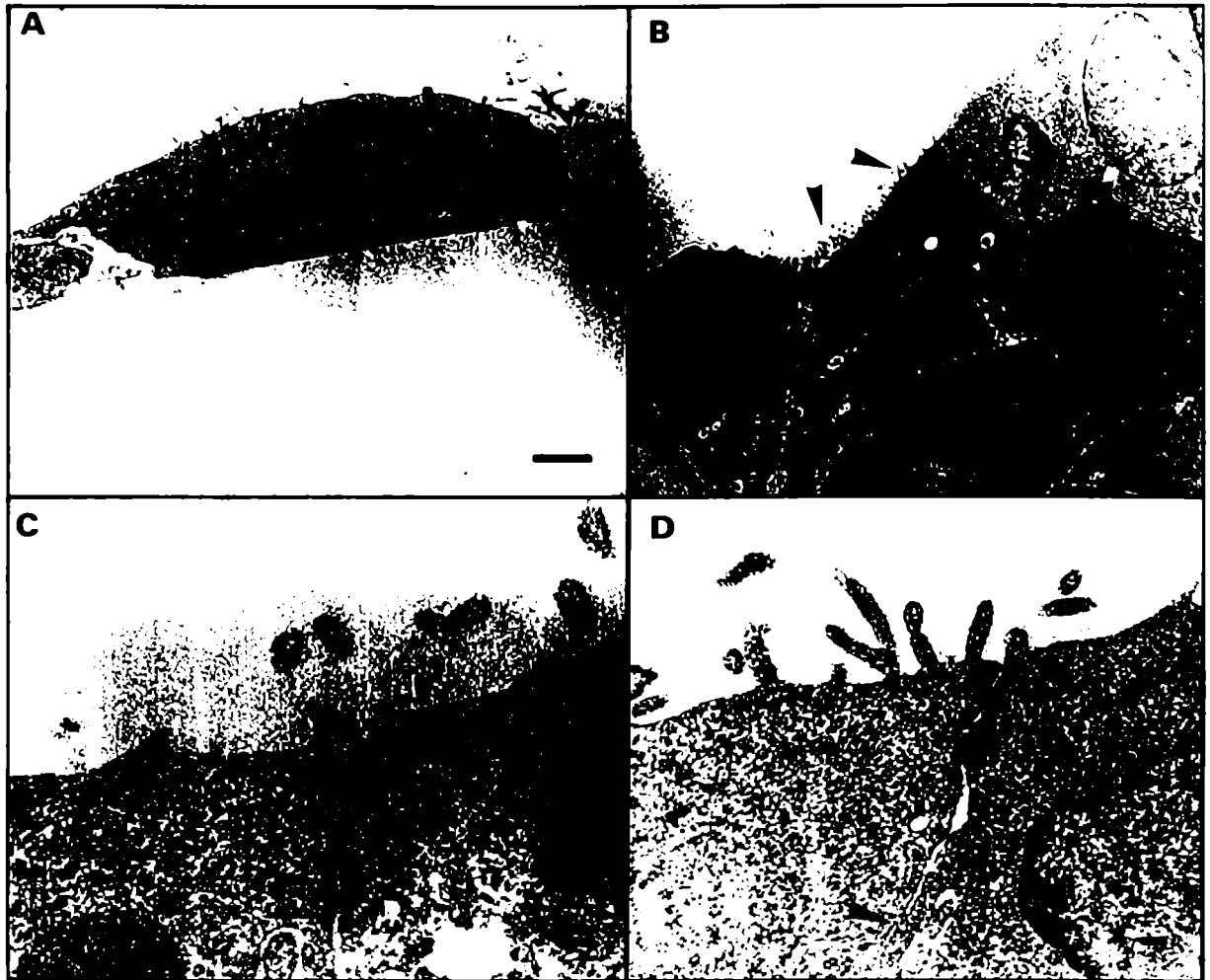
#### **Efecto de la expresión del Cdx1 sobre las células IEC-6. Estudio ultraestructural**

En 1996, el grupo del Dr Traber reportó que la sobre-expresión del Cdx2 era capaz de inducir la diferenciación de células embrionarias de intestino y un retardo en su proliferación (Suh *et al.*, 1996). Aunque encontramos que la expresión del Cdx1 no es capaz por sí solo de inhibir el crecimiento de HT29, mostramos que este gen potencia el efecto producido por el Cdx2. Aparentemente, estos genes homeóticos comparten algunas funciones, o por lo menos, muestran un cierto grado de solapamiento en ellas. Por ejemplo, el epitelio intestinal de los ratones Cdx1<sup>-/-</sup> mostraron un desarrollo normal y su aspecto parece ser también normal. Esto puede sugerir dos cosas: i) que el gen Cdx1 no juega ningún rol en estos procesos o ii) que algún otro gen sea capaz de suplir su función. El Cdx2 es un buen

candidato para esta segunda opción, ya que además de sus características estructurales comparables, ambos genes comparten grandes similitudes temporales y espaciales en su expresión. En otras palabras, estos genes son co-expresados al mismo tiempo y en el mismo lugar. Además, a favor de esta hipótesis cuenta el siguiente hecho: aunque los ratones  $Cdx2^{-/-}$  no son viables, los ratones  $Cdx2^{+/-}$  adquieren características fenotípicas similares a los normales, en el nacimiento y durante los primeros meses de vida. Esto también hace pensar en la existencia de un gen capaz de reemplazar su función. El  $Cdx1$ , aparentemente, es el mejor candidato.

Previamente, el grupo del Dr Traber mostró que las células embrionarias IEC-6 no expresan el  $Cdx1$  ni el  $Cdx2$  (Suh *et al.*, 1996). Estas células fueron transfectadas para sobre-expresar  $Cdx1$  (según se describe en Materiales y Métodos). Las células IEC-6 transfectadas con la proteína CAT (IEC-6/CAT) mostraron un crecimiento en monocapa de células aplanadas, sin evidencia de diferenciación celular (**fig 35a**). Las células IEC-6/CAT mostraron características similares a las células IEC-6 parentales. En cambio, las células IEC-6 transfectadas con el  $Cdx1$  crecieron en multicapa. En la **figura 35b** se ve un epitelio columnar con algunas características que recuerdan al epitelio intestinal. El tipo de células predominantes asemeja a los enterocitos intestinales con uniones estrechas, microvellosidades e interdigitaciones laterales de membranas (**fig 35c y d**). Este resultado muestra que la sobre-expresión del  $Cdx1$  es suficiente para inducir diferenciación en las células IEC-6. Los resultados obtenidos son semejantes a los observados después de la transfección del  $Cdx2$  (Suh *et al.*, 1996), indicando que la función de ambos genes podría ser en parte redundante.





**Figura 35:** Estudio morfológico de las células IEC-6 transfectadas con el Cdx1. Microscopía electrónica de transmisión de células post-confluentes (28 días). **A)** células IEC-6/CAT (barra=2µm). **B)** células IEC-6/Cdx1S Obsérvese las microvellosidades (flechas) (barra=2µm). **C)** células IEC-6/Cdx1S. Obsérvese la unión estrecha (flechas) (barra=200nm). **D)** células IEC-6/Cdx1S. Obsérvese la interdigitación lateral de la membrana (flecha) (barra=200nm). Las secciones son perpendiculares a la base de la caja de cultivo.

**Estudio de la migración celular *in vitro* en células HT29 transfectadas**

Durante la formación de la metástasis, las células tumorales deben abandonar el tumor original para diseminarse por el organismo a través de la circulación sanguínea. Este hecho implica la adquisición, por las células, de diversas características que incluyen un potencial migratorio más elevado. Para establecer la participación de los genes homeóticos Cdx1 y Cdx2 durante la progresión de la metástasis, nosotros ensayamos la movilidad de las células HT29, HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S utilizando la técnica de la "herida" (Bürk, 1973). Después de una estimulación de 24 hs con PMA (un activador de la PK-C), la migración celular fue cuantificada contando el número de células que atravesó la línea marcada por el bisturí (**fig 36**). Mientras que las células HT29, HT/CAT, HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS no muestran diferencias significativas en su migración, las células HT/Cdx1S y HT/Cdx2S muestran una inhibición de alrededor del 60%. Las células HT/Cdx-1S-2S muestran una muy baja sensibilidad a la estimulación. La capacidad de migración es sólo del 15% respecto de las células control (**fig 37**). La sobre-expresión del gen Cdx1 o del Cdx2 provoca una disminución importante de la capacidad de migración de las células HT29, pero la sobre-expresión simultánea de ambos genes reprime casi totalmente su potencial migratorio. Cuando estos experimentos fueron realizados en presencia de mitomicina (un inhibidor de la mitosis), los resultados fueron similares. Esto elimina la posibilidad que las diferencias obtenidas fueran debidas a un efecto sobre la proliferación celular.

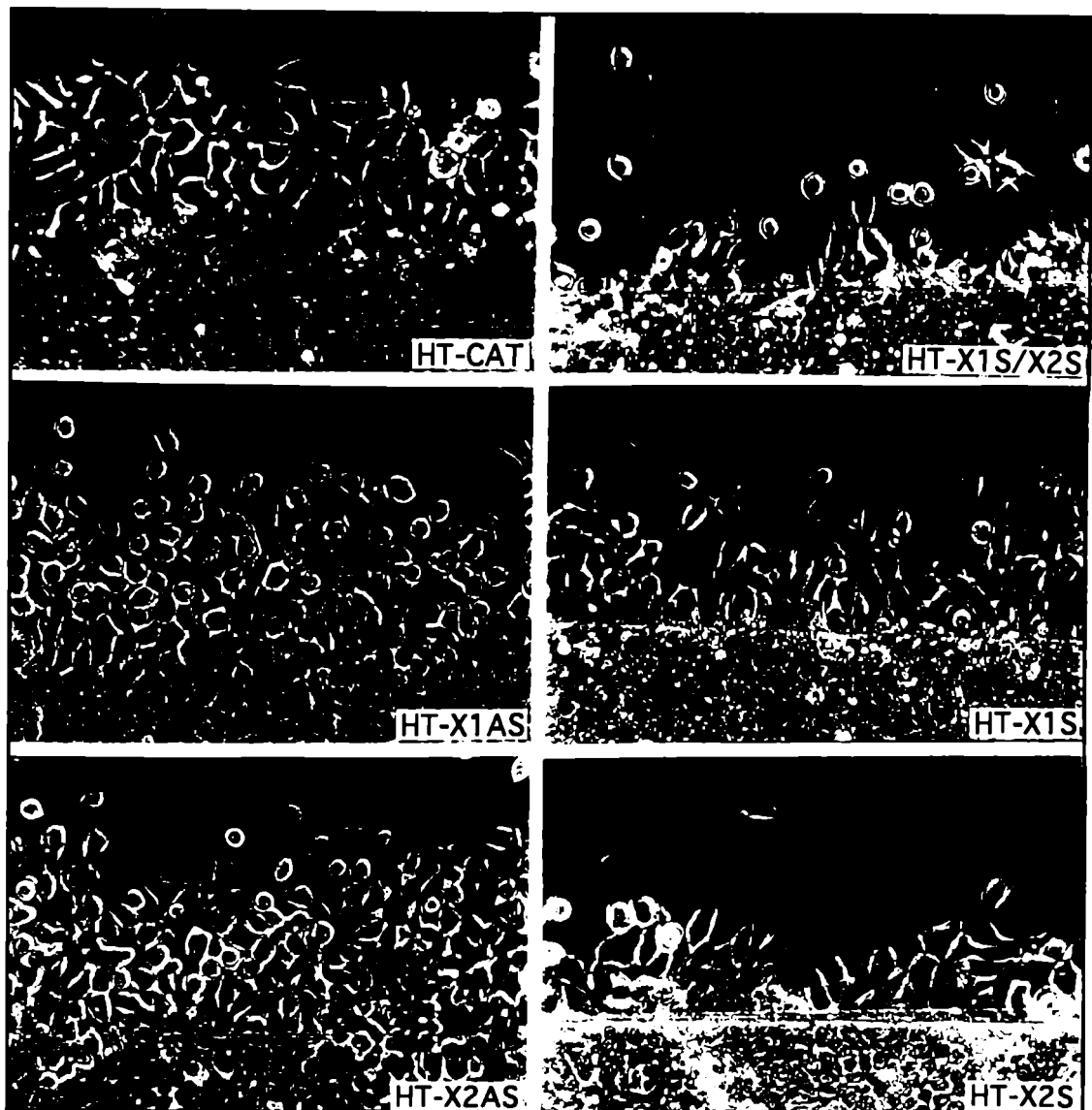
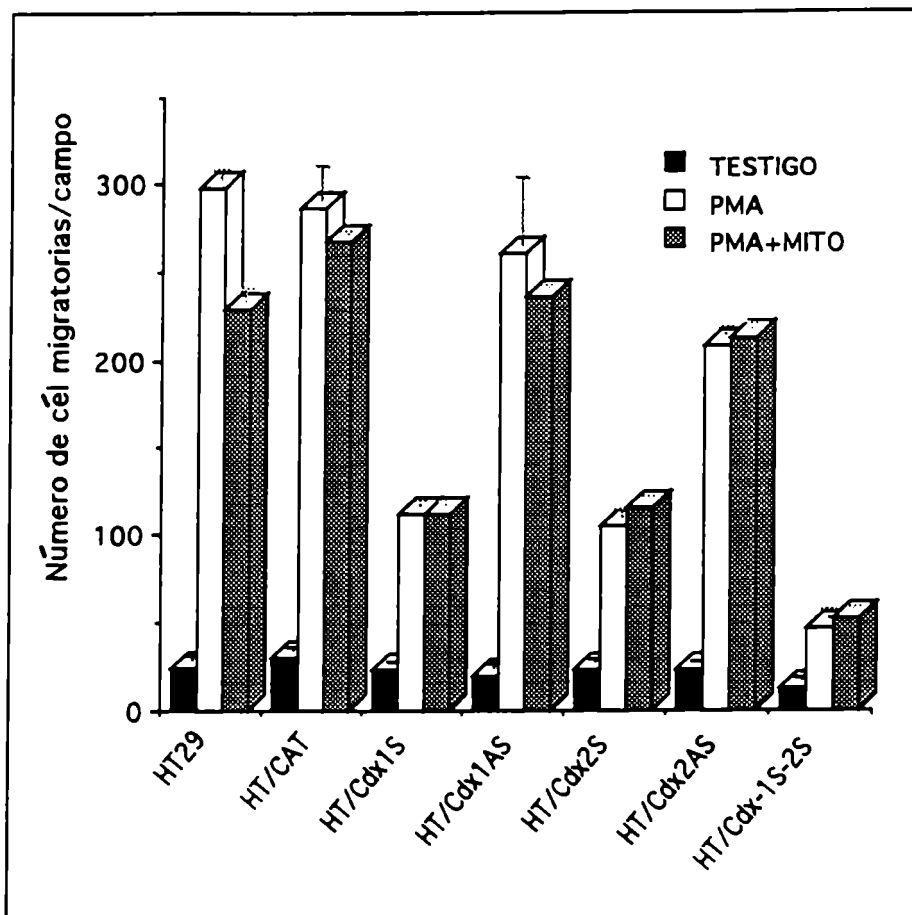


Figura 36: Aspecto de las células HT29 transfectadas después de 24 hs de migración, estimuladas con PMA.



**Figura 37:** Cuantificación de la migración de células HT29 transfectadas después de 24 hs. **Testigo:** tasa de migración basal de las células. **PMA:** tasa de migración basal de las células estimuladas con PMA. **PMA + MITO:** tasa de migración basal de las células estimuladas con PMA y tratadas con mitomicina.

### Estudio de la expresión de integrinas en células HT29 transfectadas

La progresión del tumor y la metástasis es determinada, al menos en parte, por el balance establecido entre los receptores disponibles en la superficie de la célula y la naturaleza de la matriz extracelular. En este sentido, las integrinas, receptores de membrana involucrados en la interacción célula-matriz, fueron descritas también como mediadores de la diferenciación y la migración celular. Por este motivo, nos pareció interesante estudiar si la expresión de los genes homeóticos (Cdx1 y Cdx2) era capaz de modular la expresión de las diversas integrinas ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,

$\beta 1$  y  $\beta 4$ ). La expresión de las integrinas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 4$  mostró estar aumentada en las células HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS mientras que no pareció variar en las células que sobre-expresan los ARNm del Cdx1 y Cdx2 o ambos (**fig 38**). Por el contrario, la expresión de la integrina  $\alpha 2$  disminuye significativamente en las células HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS, manteniéndose invariable en HT/Cdx1S, HT/Cdx2S, HT/Cdx1S-2S. Por último, la expresión de la integrina  $\beta 1$  no se modificó y la expresión de  $\alpha 5$  no se detectó (valores cercanos al *back-ground*).

### ***DISCUSION***

Los resultados obtenidos muestran que el Cdx1 y el Cdx2, solos o en combinación, participan en el crecimiento, la apoptosis, la migración celular y la expresión de varias moléculas en la línea celular de colon humana HT29. El crecimiento celular anormal, el aumento de la resistencia a la apoptosis, los cambios en la expresión de algunas integrinas, la desdiferenciación celular y un aumento en el potencial migratorio, son algunos de los eventos más relevantes durante la progresión del cáncer. La sub-expresión de los genes homeóticos (Cdx1 y Cdx2) en el cáncer colorectal podría ser responsable, al menos en parte, de los cambios fenotípicos observados durante este proceso y en consecuencia de su progresión.

La participación de los genes homeóticos durante la transformación celular y la progresión del cáncer fue ampliamente postulada (Aberdam *et al.*, 1991; Care *et al.*, 1996). Varios estudios se focalizaron en confirmar esta hipótesis en diversos tipos de tumores (Prasad *et al.*, 1995; Care *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1996), incluyendo el cáncer colorectal (Barba *et al.*, 1993). Los resultados de esos estudios no fueron hasta ahora convincentes, posiblemente porque los candidatos elegidos no fueron los adecuados.

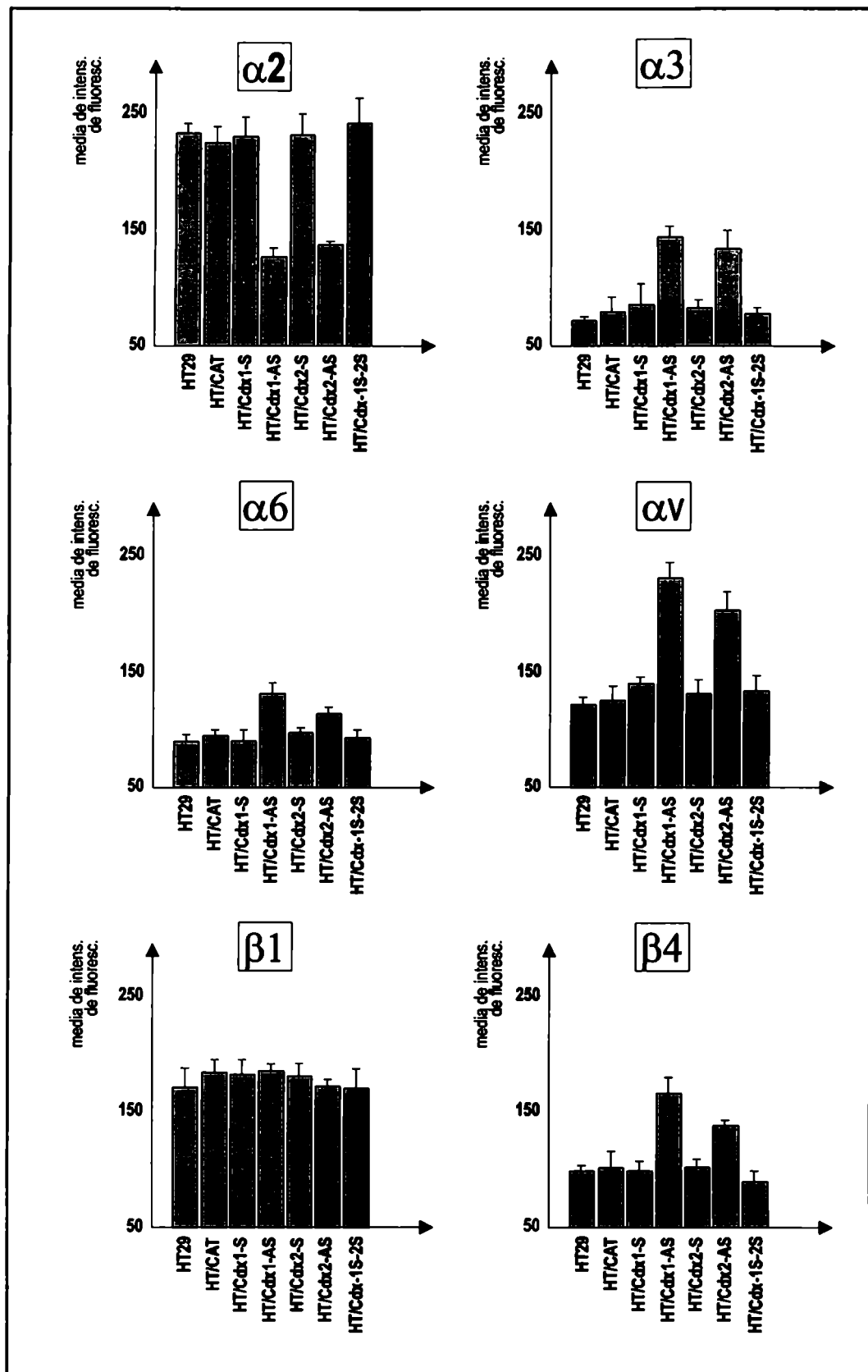


Figura 38: Análisis de la expresión de las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 4$  por citometría de flujo en las células HT29 transformadas: HT29 parentales, HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S, HT/Cdx2AS y HT/Cdx-1S-2S, con anticuerpos mono-específicos.

Los genes homeóticos Cdx1 y Cdx2 son dos candidatos interesantes para reevaluar esta hipótesis ya que, contrariamente a lo usual dentro de los genes homeóticos, el único órgano que produce cantidades detectables de estos transcritos es el intestino (Duprey *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994; Mallo *et al.*, 1997).

**Efecto de la expresión de los Cdx sobre el crecimiento en células HT29.**

Debido a que la expresión de los Cdx1 y Cdx2 baja durante la progresión del cáncer, proceso caracterizado por un aumento en la proliferación celular en el colon (Mallo *et al.*, 1997), nosotros especulamos que su sobre-expresión en la línea celular de colon humana HT29, podría afectar su crecimiento. No se observaron diferencias significativas entre las células que sub-expresaban los Cdx1 y Cdx2 y los controles HT/CAT o las HT29 parentales. Sin embargo, las células HT/Cdx2S crecieron sólo un 55%. Esos resultados concuerdan con reportes previos en los cuales la sobre-expresión del Cdx2 en células derivadas de intestino de rata (IEC-6) disminuyen su crecimiento (Suh *et al.*, 1996), y con estudios en ratones Cdx1<sup>-/-</sup> en los que no se describieron cambios en el crecimiento de células intestinales (Subramanian *et al.*, 1995). Sin embargo, la sobre-expresión de ambos conjuntamente (Cdx1 y Cdx2), mostró una disminución del crecimiento muy importante (80% respecto a los controles). Esto muestra que el efecto del Cdx2 es fuertemente potencializado por el Cdx1, aunque no tenga por sí mismo un efecto significativo.

Probablemente más de un mecanismo esté implicado en el crecimiento de células tumorales. La línea celular HT29 expresa altos niveles del receptor Ron (Ronsin *et al.*, 1993), el cual fue identificado como un receptor para el MSP (*Macrophage Stimulating Protein*). Inicialmente el MSP fue caracterizado como un factor

quimiotáctico de los macrófagos (Skeel *et al.*, 1991), pero actualmente se sabe que ejerce un amplio espectro de actividades biológicas, sobre todo en epitelios y en células neuroendocrinas (Gaudino *et al.*, 1995). La activación del Ron induce una respuesta invasiva, causando disociación celular, movilidad e invasión de la matriz extracelular sin producir transformación celular (Santoro *et al.*, 1996). A partir de estos datos quisimos saber si las diferencias observadas en el crecimiento correlacionaban con la expresión del Ron, y encontramos que la sobre-expresión del Cdx1, del Cdx2 o de ambos no afectaba los niveles del Ron (**fig 32**), sugiriendo que la disminución del crecimiento que observamos no depende de este receptor. Sin embargo, cuando la expresión del Cdx1 y del Cdx2 fue bloqueada por el efecto de cada anti-sense, la del Ron fue incrementada un 84 y un 130% respectivamente (**fig 32**), sugiriendo que ambos Cdx ejercen un efecto supresor sobre la expresión del Ron. Como la sobre-expresión no altera los niveles del Ron en la superficie celular, es posible deducir que con muy bajos niveles de Cdx se alcance la máxima expresión del Ron. No hemos todavía estudiado si la disminución en la expresión del Ron ocurre directamente sobre su gen, o si es mediada por otras moléculas o mecanismos. Quizá, la expresión del Ron es inducida sólo cuando la expresión de los dos Cdx está fuertemente reprimida, situación que ocurre en los estadios más avanzados del cáncer colorectal (Mallo *et al.*, 1997), y en este caso el Ron induzca disociación celular, movilidad e invasión. Es evidente, que el sistema que relaciona el crecimiento, el Ron y los Cdx1 y Cdx2 es complejo, y quizá comprenda otras moléculas que hasta ahora no fueron relacionadas a este proceso.

### **Aumento de la sensibilidad a la apoptosis en las células HT/Cdx-1S-2S**

Las células tumorales tienen aumentada su resistencia a la muerte celular programada, lo que favorece el crecimiento del tumor y es responsable del aumento



de su resistencia a los agentes citotóxicos. Entonces, investigamos si la expresión del Cdx1, Cdx2 o ambos afectaba la sensibilidad a la apoptosis, inducida por la ausencia de suero en el medio de cultivo. En la **figura 34b** se observa entre un 5 y 7% de células apoptóticas en las líneas HT29, HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx1AS, HT/Cdx2S y HT/Cdx2AS después de 96 hs de incubación sin suero, mientras que el porcentaje de células apoptóticas en las células doble-transfectadas (HT/Cdx-1S-2S) aumentó a un 16% (cuantificado por citometría de flujo). Es interesante destacar, que todas las células estudiadas tienen un porcentaje similar de apoptosis (menos del 1%), cuando son cultivadas en presencia de suero, sugiriendo que la sobre-expresión de ambos Cdx en la misma célula no induce la apoptosis, pero sí incrementa su sensibilidad.

Actualmente, existen varias estrategias para tratar de controlar el crecimiento tumoral: a través de la transferencia de genes que aumentan la muerte celular programada (terapia génica), o incrementando la sensibilidad de las células tumorales por agentes citotóxicos (por ej. bloqueando la activación del anti-apoptótico NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*)). Esto demuestra, que aumentar la sensibilidad de un tumor a la apoptosis puede tener repercusiones clínicas considerables. En este sentido, la sobre-expresión del Cdx1 y del Cdx2 podría ser una estrategia alternativa en el tratamiento del cáncer de colon por la transferencia de genes (terapia génica), induciendo farmacológicamente su expresión, o a través de su inducción con ácido retinoico como se mostró en la **figura 29**.

#### **Influencia de la expresión de los Cdx en la migración celular**

En un estado avanzado del cáncer de colon (Dukes D), los tumores adquieren la capacidad de atravesar la matriz extracelular y diseminarse por el torrente sanguíneo, dando origen al proceso metastático. Este proceso necesita, entre otras

cosas, un aumento en la capacidad de migración de las células tumorales. Para estudiar nuestra hipótesis original, según la cual los genes homeóticos Cdx1 y Cdx2 podrían actuar como genes "maestros" y coordinar más de un evento relacionados con el cáncer (proliferación, apoptosis, metástasis), nosotros analizamos la capacidad de migración *in vitro* de las células HT29 transfectadas. Las células HT/Cdx1AS y HT/Cdx2AS, mostraron un potencial migratorio comparable a los controles (HT29 y HT/CAT), por el contrario la sobre-expresión del Cdx1 y del Cdx2, provoca una neta disminución de la migración de aproximadamente un 60% en ambos casos. Además, las células que co-expresan los dos Cdx (HT/Cdx-1S-2S), presentan una inhibición de la migración del orden del 85% respecto de los controles (fig 37). Pareciera que la acción de los dos Cdx pudiera adicionarse. Este efecto aditivo puede tener dos causas principales que no se excluyen mutuamente. Por un lado, ambos genes podrían regular independientemente diferentes genes implicados en la migración celular. Así, la expresión de los dos genes homeóticos podría permitir aumentar el número de genes que participan en la regulación de la migración. Por otro lado, es posible que los Cdx sean capaces de potencializar cada uno el efecto del otro, de la misma forma que el Cdx1 potencializa el efecto del Cdx2 en la proliferación celular.

#### **Expresión de Integrinas en las células HT29 transfectadas**

Los últimos estadios del cáncer son caracterizados por la invasión de la matriz extracelular y la metástasis. Fue descrito que las integrinas están implicadas en este proceso. Varios estudios describen cambios en la expresión de distintas integrinas durante la progresión del cáncer y algunos de esos cambios fueron asociados con su agresividad. La familia de las integrinas está compuesta por 15 subunidades  $\alpha$  y 8  $\beta$  que se combinan para formar aproximadamente 20 diferentes

heterodímeros  $\alpha\beta$  sobre la membrana celular. Las integrinas fueron originariamente descritas como una familia de receptores responsables del anclaje a la matriz extracelular. Actualmente se conoce también su participación en ciertas vías de activación intracelular, en la inducción de algunos genes, en la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Varner *et al.*, 1996). Como la sub-expresión de los Cdx está asociada a la progresión del cáncer colorectal, nosotros hipotetizamos que los Cdx podrían regular la expresión de algunas integrinas en las células HT29. El resultado de la expresión de las integrinas estudiadas fue complejo. Las integrinas  $\alpha3$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta4$  no mostraron diferencias entre HT29, HT/CAT, HT/Cdx1S, HT/Cdx2S y HT/Cdx-1S-2S, sin embargo cuando la expresión del ARNm Cdx1 o del Cdx2 fue bloqueada por una estrategia anti-sense, los niveles de éstas integrinas aumentaron significativamente. El comportamiento de la integrina  $\alpha2$  fue inverso, es decir, ella es sub-expresada en las células que sobre-expresan el Cdx1 y el Cdx2 (HT/Cdx1S, HT/Cdx2S). La integrina  $\beta1$  no sufrió cambios de expresión y la  $\alpha5$  se mantuvo en los niveles de marcación inespecífica. Estos resultados muestran que la sobre-expresión del Cdx1 y del Cdx2, independiente o en combinación una con la otra, no inducen cambios sobre las integrinas estudiadas (excepto para  $\alpha2$ ). No obstante los cambios fueron observados cuando su expresión fue bloqueada por cada anti-sense.

Es interesante remarcar, que los cambios observados en los niveles de integrinas correlacionan con trabajos que establecen una relación entre los niveles de expresión de las integrinas y la agresividad de las células o tumores. Por ejemplo, niveles altos de  $\alpha3$  y  $\alpha6$  fueron asociados con la transformación celular y la progresión del tumor. La integrina  $\alpha3$  es sobre-expresada en el 82% de los tumores metastáticos (Bartolazzi *et al.*, 1994), y la integrina  $\alpha6$  incrementa sus niveles en

tumores de cabeza, cuello (Van Waes *et al.*, 1992), vejiga (Liebert *et al.*, 1993) y en cáncer de pulmón (Costantini *et al.*, 1990). La integrina  $\alpha 6$  heterodimeriza con la  $\beta 4$ , quien también es sobre-expresada en células HT29 que expresan los Cdx1 y Cdx2 anti-*sense*. La expresión anormal de  $\beta 4$  facilita al carcinoma colorectal a invadir matrices extracelulares (Chao *et al.*, 1996). La expresión de la integrina  $\alpha v$  se reportó en melanomas metastáticos pero no en benignos (Danen *et al.*, 1995), y además cuando se seleccionaron células por la pérdida de la integrina  $\alpha v$ , éstas mostraron una pérdida de la proliferación celular y una reducción en la tumorigenicidad, las que se recuperaban cuando se restituía la expresión de dicha integrina (Felding-Habermann *et al.*, 1992). Por el contrario, una pérdida en la expresión de  $\alpha 2$  fue asociada al fenotipo transformante en células epiteliales de mama (Zutter *et al.*, 1995). Una reducción en los niveles de expresión del ARNm anti-*sense* de esta integrina, induce un fenotipo transformante en las mismas células (Keely *et al.*, 1995). Por último, la re-expresión ectópica de  $\alpha 2$  en células de carcinoma mamario induce su diferenciación (Zutter *et al.*, 1995). La expresión de  $\beta 1$  no se modificó en las células transfectadas, sugiriendo quizás que sus niveles se regulan por un camino Cdx-independiente.

Un fenotipo más agresivo fue observado cuando la expresión de los Cdx es bloqueada por cada anti-*sense*, apoyando la hipótesis en la cual la sub-regulación de los Cdx es la responsable, por lo menos en parte, de la progresión del cáncer colorectal. Aunque estos resultados son excitantes, no son concluyentes y necesitan de más trabajo para confirmar esta hipótesis.

**Efecto tumoral *in vivo* de células HT29 transfectadas en ratones NUDE**

Nosotros mostramos que la expresión de los genes homeóticos Cdx1 y Cdx2, es capaz de modular numerosas funciones en células tumorales de colon, por ej. la proliferación, la sensibilidad a la apoptosis, la migración celular y la expresión de diferentes genes. Aún, otras modificaciones fenotípicas podrían estudiarse *in vitro*, sin embargo, a esta altura nos pareció necesario determinar el comportamiento *in vivo* de las células HT29 transfectadas. Para ello, los ratones inmunodeprimidos NUDE representan una excelente elección, ya que permiten el crecimiento de células foráneas que escapan a su control inmunitario. El bloqueo de la expresión endógena del Cdx2 (células HT/Cdx2AS), permitió a estas células desarrollar tumores netamente más rápido que los controles utilizados. Por el contrario, el aumento simultáneo de la expresión de ambos Cdx en las células HT29, provoca una inhibición del crecimiento tumoral del orden del 40% (fig 33). Estos resultados confirman los precedentes, donde el restablecimiento de la expresión de los dos genes Cdx1 y Cdx2 en las células tumorales, confiere a estas células un fenotipo menos virulento. De la misma forma, la sobre-expresión del gen Cdx2 *in vitro* mostró una inhibición parcial en el crecimiento de las células HT29 transfectadas, mientras que las células que tienen bloqueada la expresión del mismo gen (HT/Cdx2AS), desarrollaron tumores cuyo crecimiento fue más rápido que el de los controles. Estos dos resultados, complementarios, obtenidos en condiciones experimentales diferentes, prueban que la sobre-expresión del Cdx2 inhibe la proliferación en las células HT29 y validan la calidad de los resultados obtenidos por nuestras técnicas.

**Estudio de la diferenciación en células derivadas del epitelio intestinal**

Como habíamos remarcado en la sección referente al clonado de los Cdx1 y Cdx2 humanos, existen variadas evidencias que permiten sostener la hipótesis, según la cual estos genes participarían en la diferenciación y en el posterior establecimiento del fenotipo intestinal. Previamente, nosotros buscamos cambios morfológicos inducidos por la sobre-expresión o bloqueo de los Cdx1 y Cdx2 en las células HT29, y no encontramos variaciones significativas respecto a los controles. Paralelamente, el equipo del Dr Traber reportó una inducción de la diferenciación celular por la sobre-expresión del Cdx2, en células no transformadas derivadas de intestino (Suh *et al.*, 1996). Los resultados mostrados en este trabajo (fig 35) evidencian que el Cdx1, de la misma forma que el Cdx2, es suficiente para inducir un grado importante de diferenciación en las células IEC-6. En contraposición, el control utilizado (IEC-6/CAT), mostró un grado muy escaso de diferenciación parecido al observado en las células IEC-6 parentales. Sumando los resultados obtenidos por el grupo del Dr Traber con el Cdx2, a los descritos por nosotros, es posible concluir que ambos genes por sí solos son capaces de inducir diferenciación en células no diferenciadas. Nosotros reportamos una sub-expresión concomitante para ambos Cdx durante la progresión tumoral (Mallo *et al.*, 1997). Es posible, que el fenotipo intestinal diferenciado desaparezca, sólo cuando la expresión de ambos genes sea conjuntamente reprimida.

**CONCLUSION**

Durante los últimos años, toda la atención fue dirigida sobre la genética del cáncer, y fue ignorado el potencial productivo de examinar los eventos, que derivan de la expresión diferencial de genes entre el estado tumoral y el normal. A través de los

trabajos, sobre todo del grupo de Bert Vogelstein, sólo los genes mutados fueron considerados como buenos candidatos para entender la problemática del cáncer. Sin embargo, el fenotipo tumoral es la consecuencia directa de una expresión anormal de muchos genes. Las secuencias que carecen de mutaciones, o no, pero que tienen alterado su patrón de expresión, son la clave para entender las bases moleculares del cáncer y diseñar posibles agentes quimio-terapéuticos a partir de ellas.

Nosotros dirigimos toda nuestra atención sobre los genes que están expresados diferencialmente en el tumor colorectal, porque ellos son los responsables de los cambios fenotípicos que ocurren en el cáncer. A través de esta estrategia, nuestro laboratorio aisló dos genes homeóticos, Cdx1 y Cdx2, sub-expresados durante la progresión del tumor colorectal. Estos genes, probablemente no estén implicados en los primeros eventos que llevan a la cancerización. La sub-expresión de los Cdx1 y Cdx2 podría estar regulada por la metilación del ADN genómico, ya que el rol de la metilación es actualmente foco de atención en el cáncer (Herman *et al.*, 1996; Lengauer *et al.*, 1997).

Nosotros mostramos que la sub-expresión de estos genes en el cáncer de colon, está asociada a un aumento de la proliferación celular, a una disminución de la sensibilidad a la apoptosis y a un potencial migratorio más importante, lo que globalmente corresponde a un aumento en la agresividad del tumor. También, el mantenimiento de una concentración adecuada de la expresión de los genes Cdx1 y Cdx2 en células intestinales, es importante para inducir o conservar un fenotipo diferenciado normal. Así, estos dos genes podrían ser un blanco potencial para una terapia de diferenciación (Pierce *et al.*, 1988). Es importante hacer notar que en los tumores de colon estudiados, los genes Cdx1 y Cdx2 son simultáneamente sub-expresados. Nosotros encontramos que, pese al restablecimiento de ciertas

funciones por la expresión de uno de los dos genes, el efecto de la co-expresión es más importante. Recientemente se demostró que solamente la sub-expresión del Cdx2 es capaz de generar la aparición de pólipos en el colon (Chawengsaksophak *et al.*, 1997). Sin embargo, nosotros mostramos que algunas funciones necesitan la co-expresión del Cdx1 y Cdx2 (disminución en la velocidad del crecimiento celular y sensibilidad a la apoptosis). Nuestros resultados nos permiten hipotetizar que los efectos provocados por los Cdx dependen de su concentración intracelular. Dicho de otra forma, altas concentraciones de estas proteínas facilitan a las células a entrar en apoptosis, a retardar su crecimiento y a disminuir su capacidad de migración, y este podría ser el caso de células normales de colon o en los primeros pasos del cáncer colorectal. Luego, la sub-expresión de los Cdx durante la progresión del tumor sería la responsable de los cambios en la expresión del Ron e integrinas, permitiendo un aumento de migración celular, el cual lleva a la invasión y la metástasis en los estadios terminales del cáncer.



***CONSIDERACIONES GENERALES  
SOBRE EL SCREENING DIFERENCIAL***

La intención de este trabajo es demostrar la efectividad de dos estrategias combinadas. Por un lado, el secuenciamiento sistemático de una biblioteca de ADNc representando el fenotipo de un tumor colorectal, y por el otro, un eficiente método para aislar una gran cantidad de genes expresados diferencialmente. Estas dos técnicas combinadas, nos permiten determinar genes expresados diferencialmente y al mismo tiempo seleccionarlos para su estudio según un orden de prioridad, de acuerdo a la homología de su secuencia o de algún dominio en particular o, al contrario, a la ausencia de homologías conocidas.

Nosotros encontramos que alrededor de 200 clones estaban expresados diferencialmente en cada paciente estudiado. Sin embargo menos de la mitad (74 clones) estaban expresados diferencialmente en los cinco pacientes estudiados. No encontramos falsos positivos en los clones que seleccionamos para estudiar, al contrario, encontramos que los resultados obtenidos por el screening diferencial fueron rigurosamente reproducibles por una técnica independiente (*Northern blot*) y generalmente aceptada como fiable para detectar diferencias en la expresión de genes. Sin embargo, somos conscientes que estudiando cinco pacientes, la cantidad de clones siempre expresados diferencialmente se reduce a menos de la mitad. Esto puede deberse a artificios de la técnica o simplemente, a variaciones en la expresión de genes entre los distintos individuos estudiados.

Poco se conoce sobre el mecanismo que origina un tumor colorectal y su posterior desarrollo, sin embargo mucho se avanzó en el área de la genética del cáncer y mucho se va a avanzar en el estudio de genes expresados diferencialmente durante los distintos estadios del proceso tumoral. Nosotros creemos que el aporte combinado de estas dos técnicas, suman al estudio del cáncer de colon una nueva estrategia práctica, rápida y confiable para, en poco tiempo, encontrar nuevos genes involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, no encontramos ningún impedimento teórico para aplicar esta estrategia al estudio de

otras enfermedades o diferentes situaciones que involucren la expresión diferencial de genes.

***BIBLIOGRAFIA***

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. (1993) *Science* 260: 812.

Aberdam D, Negreanu V, Sachs L, Blatt C. The oncogenic potential of an activated Hox-2.4 homeobox gene in mouse fibroblasts. (1991) *Mol Cell Biol* 11 (1): 554.

Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. (1993) *Nat Genet* 4 (4): 373.

Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelley JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, Venter JC. Sequence identification of 2,375 human brain genes. (1992) *Nature* 355: 632.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. (1991) *Science* 252: 1651.

Ahlquist DA, Klee GG, McGill DB, Ellesfon RD. Colorectal cancer detection in the practice setting. Impact of fecal blood testing. (1990) *Arch Intern Med* 150 (5): 1041.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. (1990) *J Mol Biol* 215: 403.

Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. (1954) *Ann Surg* 139: 846.

Auffray C, Behar G, Bois F, Bouchier C, Da Silva C, Devignes MD, Duprat S, Houlgatte R, Jumeau MN, Lamy B, et al. IMAGE: molecular integration of the analysis of the human genome and its expression. (1995) *C R Acad Sci III* 318 (2): 263.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al (eds): *Current Protocols in Molecular Biology*, vols 1 & 2. New York, NY. Wiley (1988).

Avantaggiato V, Acampora D, Tuorto F, Simeone A. Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. (1996) *Dev Biol* 175 (2): 347

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. (1990) *Science* 249: 912.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. (1989) *Science* 244: 217.

Barba P, Magli MC, Tiberio C, Cillo C. HOX gene expression in human cancers. (1993) *Adv Exp Med Biol* 348: 45.

Barillari P, Ramacciato G, de Angelis R, Gozzo P, Aurello P, Indinnimeo M, Valabrega S, D'Angelo F, Fegiz G. The role of CEA, TPA and CA 19-9 in the early detection of recurrent colorectal cancer. (1989) *Int J Colorectal Dis* 4 (4): 230.

Barnard GF, Staniunas RJ, Mori M, Puder M, Jessup MJ, Steele GD Jr, Chen LB. Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma. (1993) *Cancer Res* 53 (17): 4048.

Barnard GF, Staniunas RJ, Bao S, Mafune K, Steele GD Jr, Gollan JL, Chen LB. Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. (1992) *Cancer Res* 52 (11): 3067.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. (1994a) *Cell* 76 (4): 597.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. (1994b) *J Biol Chem* 269 (33): 20807.

Barondes SH. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. (1984) *Science* 223: 1259.

Bartsch RA, Joannou C, Talbot IC, Bailey DS. Cloning of mRNA sequences from the human colon: preliminary characterization of defined mRNAs in normal and neoplastic tissues. (1986) *Br J Cancer* 54: 791.

Bates S. Clinical applications of serum tumor markers. (1991) *Ann Intern Med* 115: 623.

Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). (1993) *Nucleic Acids Res* 21 (18): 4272.

Beyer EC, Barondes SH. Secretion of endogenous lectin by chicken intestinal goblet cells. (1982) *J Cell Biol* 92 (1): 28.

Bhagwat AS. Restriction enzymes: properties and use. (1992) *Methods Enzymol* 216: 199.

Bodmer WF, Baily CJ, Bodmer J, Bussey H, Ellis A, Gorman P, Lucibello F, Murday B, Rider S, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr N. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. (1987) *Nature* 328: 614.

Boring C, Squires T, Tong T. Cancer statistics. (1991) *CA Cancer J Clin.* 41:19.

Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbauer B, Dolle P, Chambon P. Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). (1995) *Dev Biol* 170 (2): 420.

Bresalier RS, Boland CR, Itzkowitz SH, Kim YS. Basic gastrointestinal oncology. In Kern R Jr. & Blum AL (eds). (1985) *The gastroenterology annual/2*. Elsevier, Amsterdam, North Holland p 271.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. (1994) *Nature* 368: 258.

Callard D, Lescure B, Mazzolini L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. (1994) *Biotechniques* 16 (6): 1096.

Cameron AA, Dougherty PM, Garrison CJ, Willis WD, Carlton SM. The endogenous lectin RL-29 is transynaptically induced in dorsal horn neurons following peripheral neuropathy in the rat. (1993) *Brain Res* 620 (1): 64.

Canis M, Botchorishvili R, Slim K, Pezet D, Pouly JL, Wattiez A, Pomel C, Masson FN, Mage G, Chipponi J, Bruhat MA. Bowel endometriosis. Eight cases of colorectal resection. [Article in French]. (1996) *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 25 (7): 699.

Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. (1996) *Mol Cell Biol* 16 (9): 4842.

Cecchini E, Dominy PJ, Geri C, Kaiser K, SENTRY J, Milner JJ. Identification of genes up-regulated in dedifferentiating *Nicotiana glauca* pith tissue, using an improved method for constructing a subtractive cDNA library. (1993) *Nucleic Acids Res* 21 (24): 5742.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. (1988) *Cancer Res* 48 (7): 1936.

Chi K, Jones DV, Frazer ML. Expression of an Elongation Factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. (1992) *Gastroenterology* 102: 98.

Chirgwin JM, Przybyla A, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. (1979) *Biochemistry* 24: 5294.

Chiu ML, Parry DA, Feldman SR, Klapper DG, O'Keefe EJ. An adherens junction protein is a member of the family of lactose-binding lectins. (1994) *J Biol Chem* 269 (50): 31770.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. (1987) *Anal Biochem* 162 (1): 156.

Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. (1991) *J Cell Biol* 115 (5): 1437.

Cooper DN, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. (1990) *J Cell Biol* 110 (5): 1681.

Cravo M, Fidalgo P, Pereira AD, Gouveia-Oliveira A, Chaves P, Selhub J, Mason JB, Mira FC, Leitao CN. DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. (1994) *Eur J Cancer Prev* 3(6): 473.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (12): 5545.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. (1987) *Cell* 51 (6): 987.

De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E, Cillo C. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer [errores de publicacion aparecen en: *Eur J Cancer* 29 (9):1359 (1993)]. (1993) *Eur J Cancer* 29(6): 887.

Denis MG, Chadeneau C, Lecabelle MT, LeMoullac B, LeMevel B, Meflah K, Lustenberger P. Over-expression of the S13 ribosomal protein in actively growing cells. (1993) *Int J Cancer* 55 (2): 275.

Deveny K, Way L. Follow-up of patients with colorectal cancer. (1984) *Am Surg* 148: 717.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. (1991) *Nucleic Acids Res* 19 (14): 4008.

Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. (1993) *Annu Rev Cell Biol* 9: 237.

Drummond F, Sowden J, Morrison K, Edwards YH. The caudal-type homeobox protein Cdx-2 binds to the colon promoter of the carbonic anhydrase 1 gene. (1996) *Eur J Biochem* 236 (2): 670.

Duguid JR, Rohwer RG, Seed B. Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (15): 5738.

Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. (1932) *J Pathol* 35: 323.



Duprey P, Chowdhury K, Dressler GR, Balling R, Simon D, Guenet JL, Gruss P. A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. (1988) *Genes Dev* 2 (12): 1647.

Duseti NJ, Montalto G, Ortiz EM, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Mechanism of PAP I gene induction during hepatocarcinogenesis: clinical implications. (1996) *Br J Cancer* 74: 1767.

Duseti NJ, Frigerio JM, Szpirer C, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning, expression and chromosomal localization of the rat PAP III gene. (1995) *Biochem J* 307: 9.

Edelman GM, Jones FS. Cytotactin: a morphoregulatory molecule and a target for regulation by homeobox gene products. (1992) *Trends Biochem Sci* 17 (6): 228.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. (1993) *Cell* 75 (4): 817.

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. (1996) *Cell* 86 (4): 543.

Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. (1997) *Nature* 386: 796.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. (1990a) *Cell* 61(5): 759.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. (1990b) *Science* 247: 49.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer [errores de publicacion aparecen en: *Cell* 77 (1):167 (1994)]. (1993) *Cell* 75 (5): 1027.

Fletcher R. Carcinoembryonic antigen. (1986) *Ann Intern. Med.* 104: 66.

Foddy L, Stamatoglou SC, Hughes RC. An endogenous carbohydrate-binding protein of baby hamster kidney (BHK21 C13) cells. Temporal changes in cellular expression in the developing kidney. (1990) *J Cell Sci* 97: 139.

Freund JN, Boukamel R, Benazzouz A. Gradient expression of *Cdx* along the rat intestine throughout postnatal development. (1992) *FEBS Lett* 314 (2): 163.

Friedmann Y, Daniel CA, Strickland P, Daniel CW. Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. (1994) *Cancer Res* 54 (22): 5981.

Frigerio JM, Berthezene P, Garrido P, Ortiz E, Barthelémy S, Vasseur S, Sastre B, Seleznieff I, Dagorn JC, Iovanna JL. Analysis of 2166 clones from a human colorectal cancer cDNA library by partial sequencing. (1995) *Hum Mol Genet* 4 (1): 37.

Funariu G, Paraian I, Gheorghiu S. The malignant degeneration of colorectal polyps. (1990) *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Chir* 39 (1): 11.

Gao AC, Isaacs JT. Expression of homeobox gene-GBX2 in human prostatic cancer cells. (1996) *Prostate* 29 (6): 395.

Gehring WJ. Homeotic genes, the homeo box, and the genetic control of development. (1985) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50: 243.

Gerard G, Schmidt BJ, Kotewicz ML, et al. cDNA synthesis by Moloney Murine Leukemia Virus RNase H-minus reverse transcriptase possessing full DNA polymerase activity. (1992) *Focus* 14: 91.

German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. (1992) *Genes Dev* 6 (11): 2165.

Gershenfeld HK, Weissman IL. Cloning of a cDNA for a T cell-specific serine protease from a cytotoxic T lymphocyte. (1986) *Science* 232: 854.

Gitt MA, Massa SM, Leffler H, Barondes SH. Isolation and expression of a gene encoding L-14-II, a new human soluble lactose-binding lectin. (1992) *J Biol Chem* 267 (15): 10601.

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. (1985) *Science* 228: 187.

Goldsworthy TL, Butterworth BE, Maronpot RR. Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis. (1993) *Environ Health Perspect Suppl* 5: 59.

Gong Y, Cui L, Minuk GY. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. (1996) *Hepatology* 23 (4): 734.

Goslin R, Steele G, Mac Intyre J. The use of preoperative plasme CEA levels for the stratification of patients after curative resection of colorectal cancer. (1980) *Ann Surg* 192: 747

Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. (1992) *Mamm Genome* 3 (11): 609.

Gu M, Wang W, Song WK, Cooper DN, Kaufman SJ. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. (1994) *J Cell Sci* 107: 175.

- Hadari YR, Paz K, Dekel R, Mestrovic T, Accili D, Zick Y. Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. (1995) *J Biol Chem* 270 (7): 3447.
- Hagen FS, Gray CL, Kuijper JL. Assaying the quality of cDNA libraries. (1988) *Biotechniques* 6 (4): 340.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. (1996) *Science* 271: 350.
- Hampson IN, Pope L, Cowling GJ, Dexter TM. Chemical cross linking subtraction (CCLS): a new method for the generation of subtractive hybridisation probes. (1992) *Nucleic Acids Res* 20 (11): 2899.
- Hara E, Yamaguchi T, Tahara H, Tsuyama N, Tsurui H, Ide T, Oda K. DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-Latex and PCR: identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts. (1993) *Anal Biochem* 214 (1): 58.
- Hara E, Kato T, Nakada S, Sekiya S, Oda K. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. (1991) *Nucleic Acids Res* 19 (25): 7097.
- Harrison FL. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. (1991) *J Cell Sci* 100: 9.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. (1984) *Nature* 308: 149.
- Helfman DM, Fiddes JC, Hanahan D. Directional cDNA cloning in plasmid vectors by sequential addition of oligonucleotide linkers. (1987) *Methods Enzymol* 152: 349.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. (1996) *Cancer Res* 56 (4): 722.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. (1995) *Cancer Res* 55 (20): 4525.
- Hine K, Dyukes P. Serum CEA in postoperative surveillance of colorectal carcinoma. (1984) *Br J Cancer* 49: 689.
- Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. (1993) *Glycobiology* 3 (4): 297.
- Hirabayashi J, Satoh M, Kasai K. Evidence that *Caenorhabditis elegans* 32-kDa beta-galactoside-binding protein is homologous to vertebrate beta-galactoside-

binding lectins. cDNA cloning and deduced amino acid sequence. (1992) *J Biol Chem* 267 (22): 15485.

Hsu DK, Donohue PJ, Alberts GF, Winkles JA. Fibroblast growth factor-1 induces phosphofructokinase, fatty acid synthase and Ca(2+)-ATPase mRNA expression in NIH 3T3 cells. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 197 (3): 1483.

Hu Y, Kazenwadel J, James R. Isolation and characterization of the murine homeobox gene Cdx-1. Regulation of expression in intestinal epithelial cells. (1993) *J Biol Chem* 268 (36): 27214.

Hynes MA, Gitt M, Barondes SH, Jessell TM, Buck LB. Selective expression of an endogenous lactose-binding lectin gene in subsets of central and peripheral neurons. (1990) *J Neurosci* 10 (3): 1004.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. (1993) *Nature* 363: 558.

Iovanna JL, Keim V, Bosshard A, Orelle B, Frigerio JM, Duseti N, Dagorn JC. PAP, a pancreatic secretory protein induced during acute pancreatitis, is expressed in rat intestine. (1993) *Am J Physiol* 265: G611.

Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, Cleary KR, Ota DM, Nicolson GL, Lotan R. Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. (1991) *Cancer Res* 51 (1): 387.

Irimura T, Ota DM, Cleary KR. Ulex europeus agglutinin I-reactive high molecular weight glycoproteins of adenocarcinoma of distal colon and rectum and their possible relationship with metastatic potential. (1987) *Cancer Res* 47 (3): 881.

Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, Sugita Y, Bannai S. Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. (1993) *J Biol Chem* 268 (25): 18633.

Itho T, Teraoka H. Cloning and tissue-specific expression of cDNAs for the human and mouse homologues of rat pancreatitis-associated protein (PAP). (1993) *Biochem Biophys Acta* 1172: 184.

Itzkowitz S, Bloom E, Kokal W, Modin G, Hakomori S, Kim Y, Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients (1990) *Cancer* 66: 1960.

Itzkowitz S, Kim Y. New carbohydrate tumor markers. (1986) *Gastroenterology* 90: 491.

Jacobson A. Purification and fractionation of poly(A)<sup>+</sup> RNA. (1987) *Methods Enzymol* 152: 254.

- James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. (1994) *J Biol Chem* 269 (21): 15229.
- James R, Kazenwadel J. Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. (1991) *J Biol Chem* 266 (5): 3246.
- Johnson MG, Jolly PC. Analysis of a mass colorectal cancer screening program for cost-effectiveness. (1987) *Am J Surg* 154 (3): 261.
- Jones PA. DNA methylation errors and cancer. (1996) *Cancer Res* 56 (11): 2463.
- Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG. Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. (1995) *Endocrinology* 136 (4): 1332.
- Keese SK, Meneghini MD, Szaro RP, Wu YJ. Nuclear matrix proteins in human colon cancer. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (5): 1913.
- Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. (1989) *JAMA* 261 (21): 3099.
- Khandjian EW, Salomon C, Leonard N, Tremblay S, Turler H. Fibronectin gene expression in proliferating, quiescent, and SV40-infected mouse kidney cells. (1992) *Exp Cell Res* 202 (2): 464.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preinsinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, Carlson M, Joslyn G, Groden J, White R, Miki Y, Miyoshi Y, Nishisho I, Nakamura Y. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancer. (1991) *Science* 251: 1366.
- Kondoh N, Schweinfest CW, Henderson KW, Papas TS. Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation. (1992) *Cancer Res* 52 (4): 791.
- Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. (1991) *J Cell Biol* 115 (4): 887.
- Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. (1991) *N Engl J Med* 324 (11): 709.
- Kyshe-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels, a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels. (1984) *Biochem Biophys Methods* 10: 203.

Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. (1994) *Hum Mol Genet* 3: 1487.

Lambert M, Colnot S, Suh E, L'Horset F, Blin C, Calliot ME, Raymondjean M, Thomasset M, Traber PG, Perret C. cis-Acting elements and transcription factors involved in the intestinal specific expression of the rat calbindin-D9K gene: binding of the intestine-specific transcription factor Cdx-2 to the TATA box. (1996) *Eur J Biochem* 236 (3): 778.

Landoni NA, Belloni PO, Castelletto RH, Chopita NA, Jmelnitzky AC, Varela OW, Salamanca GL, Reinoso Zayas R. Current significance of polypectomy of the upper gastrointestinal tract. [Article in Spanish]. (1984) *Acta Gastroenterol Latinoam* 14 (4): 303.

Lans JI, Jaszewski R, Arlow FL, Tureaud J, Luk GD, Majumdar AP. Supplemental calcium suppresses colonic mucosal ornithine decarboxylase activity in elderly patients with adenomatous polyps. (1991) *Cancer Res* 51 (13): 3416.

Lasserre C, Christa L, Simon MT, Vernier P, Brechot C. A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. (1992) *Cancer Res* 52 (18): 5089.

Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. (1993) *Cell* 75 (6): 1215.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. (1990) *Mol Cell Biol* 10 (5): 1982.

Lemke SJ, Burke T, Boder GB, Moore RE. SPOT: an improved differential screening protocol that allows the detection of marginally induced mRNAs. (1993) *Biotechniques* 14 (3): 415.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (6): 2545.

Lennon GG, Lehrach H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. (1991) *Trends Genet* 7 (10): 314.

Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. (1993) *Nucleic Acids Res* 21 (14): 3269.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. (1992a) *Science* 257: 967.

Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. (1992b) *Cancer Res* 52 (24): 6966.

Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE, Leffler H. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. (1993) *J Biol Chem* 268 (16): 11750.

Lipkin M, Blattner WA, Gardner EJ, Burt RW, Lynch H, Deschner E, Winawer S, Fraumeni JF Jr. Classification and risk assessment of individuals with familial polyposis, Gardner's syndrome, and familial non-polyposis colon cancer from [<sup>3</sup>H]thymidine labeling patterns in colonic epithelial cells. (1984) *Cancer Res* 44 (9): 4201.

Lipkin M, Blattner WE, Fraumeni JF Jr, Lynch HT, Deschner E, Winawer S. Tritiated thymidine (phi p, phi h) labeling distribution as a marker for hereditary predisposition to colon cancer. (1983) *Cancer Res* 43 (4): 1899.

Liu FT. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. (1993) *Immunol Today* 14 (10): 486.

Lopez-Fernandez LA, del Mazo J. Construction of subtractive cDNA libraries from limited amounts of mRNA and multiple cycles of subtraction. (1993) *Biotechniques* 15 (4): 654.

Lopez SL, Dono R, Zeller R, Carrasco AE. Differential effects of retinoic acid and a retinoid antagonist on the spatial distribution of the homeoprotein Hoxb-7 in vertebrate embryos. (1995) *Dev Dyn* 204 (4): 457.

Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, Mercurio AM. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (8): 3466.

Lu X, Dengler J, Rothbarth K, Werner D. Differential screening of murine ascites cDNA libraries by means of in vitro transcripts of cell-cycle-phase-specific cDNA and digital image processing. (1990) *Gene* 86 (2): 185.

Luo G, An G, Wu R. A PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. (1994) *Biotechniques* 16 (4): 670.

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: an updated review. (1993) *Gastroenterology* 104: 1535.

Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honore B, Vorum H, Celis JE. Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. (1995) *J Biol Chem* 270 (11): 5823.

Mahanthappa NK, Cooper DN, Barondes SH, Schwarting GA. Rat olfactory neurons can utilize the endogenous lectin, L-14, in a novel adhesion mechanism. (1994) *Development* 120 (6): 1373.

Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. (1997) *Int J Cancer* 74: 35.

Mangiarotti G, Chung S, Zuker C, Lodish HF. Selection and analysis of cloned developmentally- regulated Dictyostelium discoideum genes by hybridization-competition. (1981) *Nucleic Acids Res* 9: 947.

Marschal P, Herrmann J, Leffler H, Barondes SH, Cooper DN. Sequence and specificity of a soluble lactose-binding lectin from *Xenopus laevis* skin. (1992) *J Biol Chem* 267 (18): 12942.

Masciotra L, Lechene de la Porte P, Frigerio JM, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Immunocytochemical localization of pancreatitis-associated protein in human small intestine. (1995) *Dig Dis Sci* 40 (3): 519.

Meltzer SJ, Ahnen DJ, Battifora H. Protooncogene abnormalities in colon cancers and adenomatous polyps. (1987) *Gastroenterology* 92: 1174.

Miller W, Ota D, Giacco G, Guinee V, Irimura T, Nicolson G, Cleary K. Absence of a relationship of size of primary colon carcinoma with metastasis and survival. (1985) *Clin Exp Metastasis* 3 (3): 189.

Minton J, Hoehn H, Gerber D, Horsley J, Connolly F, Oviedo M, Meyer K, Leffall L, Berk R, Stewart P, Kurucz S. Results of a 400-patient carcinoembryonic antigen second-look colorectal cancer study. (1985) *Cancer* 55: 1284.

Mlodzik M, Gehring WJ. Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. (1987) *Cell* 48 (3): 465.

Mlodzik M, Fjose A, Gehring WJ. Isolation of caudal, a *Drosophila* homeo box-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at the pre blastoderm stage. (1985) *EMBO J* 4: 2961.

Mok SC, Wong KK, Chan RK, Lau CC, Tsao SW, Knapp RC, Berkowitz RS. Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. (1994) *Gynecol Oncol* 52 (2): 247.

Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, et al. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. (1989) *Cell* 59 (2): 335.

Mou L, Miller H, Li J, Wang E, Chalifour L. Improvements to the differential display method for gene analysis. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* 199 (2): 564.



- Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, Jordan BR. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. (1995) *Genomics* 29 (1): 207.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. (1994) *Nature* 371: 75.
- Nishio Y, Aiello LP, King GL. Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cells identified by mRNA differential display. (1994) *FASEB J* 8 (1): 103.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. (1991) *Science* 253: 665.
- Nizetic D, Drmanac R, Lehrach, H. An improved bacterial colony lysis procedure enables direct DNA hybridisation using short (10, 11 bases) oligonucleotides to cosmids. (1991) *Nucleic Acids Res* 19: 182.
- Oda Y, Herrmann J, Gitt MA, Turck CW, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. (1993) *J Biol Chem* 268 (8): 5929.
- Ogura T, Evans RM. Evidence for two distinct retinoic acid response pathways for HOXB1 gene regulation. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (2): 392.
- Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. (1992) *J Clin Invest* 90 (6): 2284.
- Ortiz E, Dusetti N, Vasseur S, Dagorn JC, Iovanna J. The pancreatitis associated protein I (PAP I) is induced by free radicals in pancreatic AR4-2J cells and confers cell resistance to their aggression. (1997) *Gastroenterology* (en prensa).
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. (1994) *Science* 263: 1625.
- Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. (1993) *Science* 260: 810.
- Pfeifer K, Haasemann M, Gamulin V, Bretting H, Fahrenholz F, Muller WE. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. (1993) *Glycobiology* 3 (2): 179.
- Poirier F, Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. (1993) *Development* 119 (4): 1229.

Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL, Rigby PW. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. (1992) *Development* 115 (1): 143.

Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, Leshkowitz D, Croce CM, Canaani E. Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26): 12160.

Qin XF, Luo Y, Suh H, Wayne J, Misulovin Z, Roeder RG, Nussenzweig MC. Transformation by homeobox genes can be mediated by selective transcriptional repression. (1994) *EMBO J* 13 (24): 5967.

Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. (1997) *J Clin Invest* 99 (9): 2100.

Ralph D, McClelland M, Welsh J. RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by transforming growth factor beta 1. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22): 10710.

Raz A, Zhu DG, Hogan V, Shah N, Raz T, Karkash R, Pazerini G, Carmi P. Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis. (1990) *Int J Cancer* 46 (5): 871.

Raz A, Meromsky L, Lotan R. Differential expression of endogenous lectins on the surface of nontumorigenic, tumorigenic, and metastatic cells. (1986) *Cancer Res* 46 (7): 3667.

Regan LJ, Dodd J, Barondes SH, Jessell TM. Selective expression of endogenous lactose-binding lectins and lactoseries glycoconjugates in subsets of rat sensory neurons. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (7): 2248.

Reiertsen O, Bakka A, Tronnes S, Gauperaa T. Routine double contrast barium enema and fiberoptic colonoscopy in the diagnosis of colorectal carcinoma. (1988) *Acta Chir Scand* 154 (1): 53.

Reitmair AH, Schmits R, Ewel A, Bapat B, Redston M, Mitri A, Waterhouse P, Mittrucker HW, Wakeham A, Liu B, et al. MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. (1995) *Nat Genet* 11 (1): 64.

Reynet C, Kahn CR. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. (1993) *Science* 262: 1441.

Risio M, Lipkin M, Candelaresi G, Bertone A, Coverlizza S, Rossini FP. Correlations between rectal mucosa cell proliferation and the clinical and pathological features of nonfamilial neoplasia of the large intestine. (1991) *Cancer Res* 51(7):1917.

- Roff CF, Rosevear PR, Wang JL, Barker R. Identification of carbohydrate-binding proteins from mouse and human fibroblasts. (1983) *Biochem J* 211 (3): 625.
- Rognum T. A new approach in carcinoembryonic antigen-guided follow-up of large bowel carcinoma patients. (1986) *Scand J Gastroenterology* 21: 641.
- Rothstein JL, Johnson D, Jessee J, Skowronski J, DeLoia JA, Solter D, Knowles BB. Construction of primary and subtracted cDNA libraries from early embryos. (1993) *Methods Enzymol* 225: 587.
- Rouquier S, Verdier JM, Iovanna JL, Dagorn JC, Giorgi D. Rat pancreatic stone protein messenger RNA: Abundant expression in mature exocrine cells, regulation by food content and sequence identity with the endocrine reg transplant. (1991) *J Biol Chem* 266: 786.
- Rubenstein JL, Brice AE, Ciaranello RD, Denney D, Porteus MH, Usdin TB. Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. (1990) *Nucleic Acids Res* 18 (16): 4833.
- Sager R, Anisowicz A, Neveu M, Liang P, Sotiropoulou G. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. (1993) *FASEB J* 7 (10): 964.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- Santoro MM, Collesi C, Griseldi S, Gaudino G, Comoglio P. Constitutive activation of the RON gene promotes invasive growth but not transformation. (1996) *Mol Cell Biol* 16 (12): 7072.
- Sardi A, Nioeroda C, Siddigui M, Minton J, Martin E. Carcinoembryonic antigen directed multiple surgical procedures for recurrent colon cancer confined to the liver. (1990) *Am Surg* 56: 255.
- Sargent TD. Isolation of differentially expressed genes. (1987) *Methods Enzymol* 152: 423.
- Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. (1994) *J Biol Chem* 269 (6): 4424.
- Satoh Y, Kashimura M, Kaneko S, Karasaki Y, Higashi K, Gotoh S. Cloning of cDNAs with possible association with senescence and immortalization of human cells. (1994) *Mutat Res* 316 (1): 25.
- Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (9): 4166.
- Seruga M, Hauzer-Petrovic A. Gardner's syndrome in several family members. (1996) *Hepatogastroenterology* 43 (10): 1088.

Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. (1996) *N Engl J Med* 335 (23): 1727.

Short JM, Sorge JA. In vivo excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. (1992) *Methods Enzymol* 216: 495.

Siders WM, Klimovitz JC, Mizel SB. Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 alpha and IL-1 beta secretion. (1993) *J Biol Chem* 268 (29): 22170.

Sive HL, St John T. A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction. (1988) *Nucleic Acids Res* 16 (22): 10937.

Skrincosky DM, Allen HJ, Bernacki RJ. Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins [errores de publicacion aparecen en: *Cancer Res* 53 (15): 3652 (1993)] (1993) *Cancer Res* 53 (11): 2667.

Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. (1987) *Nature* 328: 616.

Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. (1987) *J Biol Chem* 262 (15): 7383.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. (1993) *Nature* 365: 274.

Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. (1996) *Mol Cell Biol* 16 (2): 619.

Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. (1994) *Mol Cell Biol* 14 (11): 7340.

Swalla BJ, Makabe KW, Satoh N, Jeffery WR. Novel genes expressed differentially in ascidians with alternate modes of development. (1993) *Development* 119 (2): 307.

Tachibana K, Marquardt H, Yokoya S, Friesen HG. Growth hormone-releasing hormone stimulates and somatostatin inhibits the release of a novel protein by cultured rat pituitary cells. (1988) *Mol Endocrinol* 2 (10): 973.

Takeuchi H, Toda T, Nagasaki S, Kawano T, Minamisono Y, Maehara Y, Sugimachi K. Synchronous multiple colorectal adenocarcinomas. (1997) *J Surg Oncol* 64 (4): 304.

Talley NJ, Phillips SF, Melton LJ, Mulvihill C, Wiltgen C, Zinsmeister AR. Diagnostic value of the Manning criteria in irritable bowel syndrome. (1990) *Gut* 31 (1): 77.

Taneja R, Bouillet P, Boylan JF, Gaub MP, Roy B, Gudas LJ, Chambon P. Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (17): 7854.

Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. (1996) *Nat Genet* 13 (3): 343.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. (1993) *Science* 260: 816.

Tiberio C, Barba P, Magli MC, Arvelo F, Le Chevalier T, Poupon MF, Cillo C. HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. (1994) *Int J Cancer* 58 (4): 608.

Tonelli F, Valanzano R, Monaci I, Mazzoni P, Anastasi A, Ficari F. Restorative proctocolectomy or rectum-preserving surgery in patients with familial adenomatous polyposis: results of a prospective study. (1997) *World J Surg* 21 (6): 653.

Tsutsumi T, Ido A, Nakao K, Hamasaki K, Kato Y, Ohtsuru A, Nakata K, Tamaoki T, Nagataki S. Reciprocal regulation of alpha-fetoprotein and albumin gene expression by butyrate in human hepatoma cells. (1994) *Gastroenterology* 107 (2): 499.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. (1988) *N Engl J Med* 319 (9): 525.

Wanebo H, Rao B, Pinsky C, Hoffman R, Stearns M, Schwartz M, Oettger H. Preoperative carcinoembryonic antigen levels as a prognostic indicator in colorectal cancer. (1978) *N Engl J Med* 299: 448.

Wang Z, Brown DD. A gene expression screen. (1991a) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (24): 11505.

Wang JL, Laing JG, Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. (1991b) *Glycobiology* 1 (3): 243.

Wells V, Mallucci L. Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. (1991) *Cell* 64 (1): 91.

Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. (1992) *Nucleic Acids Res* 20 (19): 4965.

Welsh M, Mares J, Karlsson T, Lavergne C, Breant B, Claesson-Welsh L. Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. (1994) *Oncogene* 9 (1): 19.

Wilcox AS, Khan AS, Hopkins JA, Sikela JM. Use of 3' untranslated sequences of human cDNAs for rapid chromosome assignment and conversion to STSs: implications for an expression map of the genome. (1991) *Nucleic Acids Res* 19 (8): 1837.

Williams RR, McIntire KR, Waldmann TA, Feinleib M, Go VL, Kannel WB, Dawber TR, Castelli WP, McNamara PM. Tumor-associated antigen levels (carcinoembryonic antigen, human chorionic gonadotropin and alfa-fetoprotein) antedating the diagnosis of cancer in the Framingham Study. (1977) *J Natl Cancer Inst* 58 (6): 1547.

Wogan GN. Diet and nutrition as risk factors for cancer. (1985) *Princess Takamatsu Symp* 16: 3

Yow HK, Wong JM, Chen HS, Lee CG, Davis S, Steele GD Jr, Chen LB. Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein [errores de publicacion aparecen en: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):7032 (1989)]. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (17): 6394.

Zenilman ME, Magnuson TH, Swinson K, Egan J, Perfetti R, Shuldiner AR. Pancreatic thread protein is mitogenic to pancreatic-derived cells in culture. (1996) *Gastroenterology* 110 (4): 1208.


Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. (1997) *Science* 197 276: 1268.

Zhang L, Medina D. Gene expression screening for specific genes associated with mouse mammary tumor development. (1993) *Mol Carcinog* 8 (2): 123.

Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. (1995) *Gene* 156 (2): 207.

## ABREVIATURAS

|           |   |
|-----------|---|
| aa        | aminoácido  |
| aprox     | aproximadamente                                     |
| col       | colaboradores                                       |
| CRD       | <i>carbohydrate-recognition domain</i>              |
| Dr        | doctor  |
| EST       | <i>Expressed Sequence Tag</i>                       |
| fig       | figura  |
| hrs       | horas   |
| kb        | kilo base   |
| kDa       | kilo Dalton   |
| M         | molar   |
| mat y mét | materiales y métodos                                |
| min       | minutos   |
| nt        | nucleótido  |
| pb        | pares de bases                                      |
| PCR       | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                    |
| pH        | potencial hidrógeno (H)                             |
| RT-PCR    | <i>Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction</i> |
| µg        | microgramo  |
| µl        | microlitro  |

  
GUSTAVO V. MALLO

  
JUAN L. IOVANNA  
Directeur de Recherche  
INSERM U. 315