
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA ORNITINA- DESCARBOXILASA (ODC) EN EL MODELO MURINO BALB/c DE CÁNCER DE COLON”

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA DE LA LUZ BLANCA ISABEL MÁRQUES GONZÁLEZ

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Noviembre de 2011



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología
COORD-BIO-098/2010.

C. MARIA DE LA LUZ BLANCA ISABEL MARQUES GONZALEZ
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título "*Estudio de la expresión de la Ornitina Descarboxilasa (ODC) en el modelo murino BALB/c de cáncer de colon*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como directora de dicho trabajo a: Dra. María del Rosario Huizar López y como asesor a la Dra. Anne M.H. Santerre y Dra. Luz Patricia Castro Felix

Sin mas por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Agujas, Nextipac Zapopan Jalisco 14 de Septiembre del 2010.



DRA. TERESA DE JESUS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. GLORIA PARADA BARREPA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "Estudio de la expresión de la Ornitina Descarboxilasa (ODC) en el modelo murino BALB/c de cáncer de colon" que realizó la pasante Maria de la Luz Blanca Isabel Márques González con número de código 301356984 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

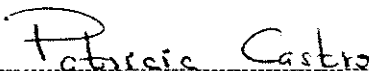
Las Agujas, Zapopan, Jal., 21 de Octubre del 2011



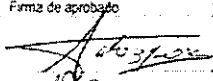
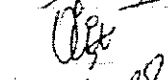
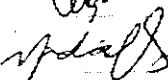
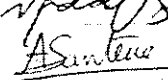
 Dra. María del Rosario Huizar López
 Directora

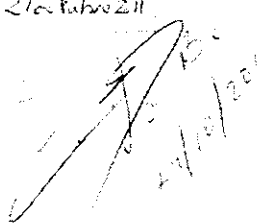


 Dra. Anne M. H. Santerre
 Asesora



 Dra. Luz Patricia Castro Félix
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Oceanólogo Salvador Velázquez Magaña		21 Oct 11
Dr. Edgardo Flores Torales		21/04/2011
Dra. Nidia Jannette Carrillo González		21/04/2011
Supl. Dra. Anne M.H. Santerre		21 de febrero 2011


 21/10/2011

SEDE

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Centro de Investigación en Genética Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Ma. del Rosario Huizar López y asesorías de la Dra. Anne M. H. Santerre y la Dra. Luz Patricia Castro Félix.

El presente trabajo forma parte de los productos de un proyecto de investigación financiado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco-Universidad de Guadalajara (COECYTJAL-UDG) con clave PS-2008-617 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con clave SALUD-2008-C01-87231.

*Las grandes obras son hechas no con la fuerza,
sino con la perseverancia.*

Samuel Johnson

Dedicatoria:

A ti Marisela

A mi hermana que ya partió a otro lado, dedicarle este presente documento quien permanentemente me apoyo con su espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y objetivos propuestos, gracias por haberme enseñado tantas cosas entre ellas a luchar por mis sueños dado siempre el máximo para seguir adelante pese a las adversidades, gracias por haber sido mi amiga, confidente y sobretodo mi hermana, gracias por haber dejado tu huella en nuestros corazones, esta tesis especialmente dedicada a ti, nadie más sabe el esfuerzo y perseverancia por la que luche durante toda la carrera, aunque no estés aquí se que en algún lado estas orgullosa de mi esfuerzo y dedicación y que no importa lo que suceda siempre se puede salir adelante cuando uno desea con intensidad todas las cosas.

Agradecimientos y Reconocimientos

A dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi familia

A mi madre por haberme dado la vida, por su esfuerzo, dedicación, amor y comprensión para salir adelante a lo largo de mi carrera, a mis hermanos Claudia y Beto por apoyarme y salir adelante en los momentos más difíciles.

A mis familiares

A mi tía Concha y mi prima Brenda, por su apoyo incondicional y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A ti Fernando

Por ayudarme a salir a delante y compartir tus conocimientos a lo largo de nuestra formación profesional, y por alentarme para seguir siendo una mejor persona, gracias por todo tu cariño y comprensión.

A mis amigas

Lili, Isaura y Margarita que siempre me han apoyado y han estado conmigo en todos los momentos buenos y malos gracias por su amistad en todos estos años.

Norma, Ale y Chepis que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigas.

A ti Abraham

Por ser mi consejero, por ayudarme en todos los momentos difíciles y por estar presente cuando más lo necesitaba, gracias por todo tu amor y paciencia.

A la Universidad de Guadalajara

Por la oportunidad que me brindo, para realizar esta carrera.

A maestros (as)

Por compartir conmigo sus conocimientos y anécdotas y por todo el apoyo brindado a lo largo de mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio

Angelina, Brenda, Irma, Mónica, Edgar, Cesar, Ricardo, Asdrúbal y Enrique por el apoyo brindado directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis y por compartir esos momentos de charla y cotorreo.

A la Dra. Rosario

Gracias por todo su apoyo para realizar este trabajo su confianza y motivación que me brindo.

A la Dra. Faty

Gracias por su esfuerzo y dedicación para lograr finalizar este trabajo, con un especial reconocimiento, por ser parte fundamental de esta tesis, por ayudarme a salir adelante y lograr los resultados obtenidos, gracias por sus consejos y motivación que me brindo.

A la Dra. Anna

Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme la confianza y enseñanzas para realizar este trabajo, por ayudarme a resolver las dificultades presentadas y por todo su apoyo.

A mis sinodales

Dra. Nidia, Dr. Edgardo y Mtro. Salvador, por su esfuerzo y dedicación para llegar a la finalización de este trabajo.

Y finalmente gracias a todas las personas que a lo largo de mi vida me han aportado un granito de su sabiduría, por sus consejos y charlas por haber confiado en mí gracias a todos ellos.

CONTENIDO

	Página (s)
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ANTECEDENTES	1
Generalidades del cáncer.....	1
Cáncer colorrectal.....	4
Factores de riesgo de cáncer colorrectal.....	4
Marcadores tumorales de cáncer colorrectal.....	6
Estadios de cáncer colorrectal.....	6
Poliaminas.....	9
Ornitina descarboxilasa.....	11
Estructura y actividad de la ODC.....	11
Degradación de la ODC.....	12
Regulación transcripcional de la ODC.....	13
Regulación traduccional de la ODC.....	13
Distribución de la ODC en tejidos.....	14
Modelos murinos de CCR.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	21
MATERIAL Y METODOS	22
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47
GLOSARIO	48
BIBLIOGRAFÍA	51

INDICE DE FIGURAS

	Página (s)
Figura 1. Estadísticas de defunciones por tumor maligno en México 1998-2008.....	3
Figura 2. Defunciones generales por sexo causadas por tumor maligno en Jalisco.....	3
Figura 3. Biosíntesis y conversión de las PAs.....	10
Figura 4. Estructura del gen <i>Odc</i> en ratón.....	13
Figura 5. Optimización de parámetros de PCR multiplex.....	29
Figura 6. Optimización de RNA total.....	31
Figura 7. Optimización de cebadores <i>Odc/β-actina</i>	32
Figura 8. Optimización de cebadores <i>Odc/β-actina</i>	32
Figura 9. Optimización de ciclos <i>Odc/β-actina</i>	33
Figura 10. Reproducibilidad de <i>Odc/β-actina</i>	34
Figura 11. Coamplificación de <i>Odc/β-actina</i>	36
Figura 12. Representación de la media de grupo DMH y control.....	37
Figura 13. Curva estándar de BSA.....	39
Figura 14. Revelado por quimioluminiscencia de β-actina	39
Figura 15. Electroforesis y electrotransferenciá de riñón.....	40
Figura 16. Electroforesis y electrotransferencia de colon.....	40
Figura 17. Revelado por quimioluminiscencia de riñón con ODC.....	41
Figura 18. Revelado por quimioluminiscencia de riñón con β-actina.....	41
Figura 19. Revelado por quimioluminiscencia de colon con ODC.....	42
Figura 20. Revelado por quimioluminiscencia de colon con β-actina.....	42

INDICE DE CUADROS

	Página (s)
Cuadro 1. Egresos hospitalarios por tumor maligno en el 2008.....	2
Cuadro 2. Cebadores de la <i>Odc</i> y <i>β-actina</i>	28
Cuadro 3. Condiciones de reacción de las PCR de <i>Odc</i> y <i>β-actina</i>	34
Cuadro 4. Programa de la amplificación de <i>Odc</i> y <i>β-actina</i>	35
Cuadro 5. Comparación de varianzas en riñón y colon con DMH.....	35
Cuadro 6. Comparación de varianzas en riñón y colon control.....	36
Cuadro 7. Comparación de varianza entre grupos.....	37
Cuadro 8. Comparación de la expresión de la <i>Odc</i> con DMH y control.....	38

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACE	Antígeno carcinoembrionario
ADN	Acido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee of Cancer</i>
ARN	Acido ribonucleico
Bis	N,N-Metilenobisacrilamida
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado centígrado
CCNPH	Cancer colorrectal no polipoide hereditario
CCR	Cancer colorrectal
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DFMO	Diflurometil ornitina
DMH	Clorhidrato de 1,2-dimetilhidracina
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
EDAS	<i>Electrophoresis Documentation and Analysis System</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Glicol de ácido etilendiaminotetraacético
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
M_MLVRT	<i>Enzima Reverse Transcriptase</i>
mg	Miligramo
Milli Q	Agua desionizada
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramo
ODC	Ornitina descarboxilasa
Odc	Ornitina descarboxilasa

OMS	Organización mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAs	Poliaminas
pH	Potencial de Hidrogeno
PLP	Fosfato 5' piridoxal
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PVDF	<i>Polivinildenedifloride</i>
<i>RNase OUT</i>	Enzima RNA out
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSA	Secretaria de Salud
<i>Taq pol</i>	Polimerasa de ADN, aislada de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Buffer Tris Base-Acido Borico-EDTA
TBS	Solución amortiguadora tris salino
TBS-T	Solución amortiguadora tris salino y Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilerndiamina
Tris-HCl	Tris Hidrocloruro
UV	Luz ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
µg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

La ornitina descarboxilasa (ODC) es la primera enzima limitante en la biosíntesis de las poliaminas (PAs), un grupo de componentes importantes en la regulación de la proliferación celular, tanto en células normales como en células malignas. La regulación de la ODC se da a múltiples niveles: transcripcional, traduccional y postraduccional. En el presente trabajo se estudió la expresión del fragmento del gen *Odc* y se evaluó la proteína ODC en riñón y colon, en un modelo murino de cáncer de colon en ratones Balb/c inducido con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH).

Nuestros resultados demuestran que las técnicas de RT-PCR semicuantitativa y Western blot fueron útiles para detectar diferencias en la expresión de la ODC a nivel transcripcional y traduccional entre ratones control y ratones tratados con DMH. Con ambas técnicas el riñón mostró una menor dispersión de los datos en relación al colon por lo que se considera al riñón un tejido más adecuado para detectar diferencias en los niveles de la ODC entre ratones control y ratones tratados con DMH.

En riñón existe una sobreexpresión de la *Odc* en ratones tratados con DMH en comparación con ratones control, así como un aumento de la proteína ODC, mientras que el análisis de las muestras de colon no arrojó resultados que permitieran llegar a la misma conclusión. Los datos experimentales permiten concluir que la ODC juega un papel importante en la patología del CCR, por lo que se propone a la ODC como una molécula biomarcadora de CCR en modelos murinos.

ANTECEDENTES

Generalidades del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades crónico degenerativas (más de 100 tipos) (Organización Mundial de la Salud OMS a, 2009), provocadas por factores genéticos y ambientales. Se caracteriza por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular; como consecuencia del desequilibrio se desarrolla una clona celular que puede invadir y destruir los tejidos adyacentes, extendiéndose hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias u ocurre propagación metastásica. Con frecuencia esta anomalía conduce a la muerte del individuo por deterioro del órgano que infecta. Este trastorno se puede referir desde los genes supresores y los oncogenes cuyos productos controlan la diferenciación y proliferación celulares (Granados y Herrera, 2010).

Los tumores malignos representan aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2020, el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo. Entre el 2007 y 2030, como resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; la mortalidad por cáncer a nivel mundial aumentará en un 45%, se estima que pasara de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, además, durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI, 2009).

La OMS señala algunos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer como el consumo de tabaco, alcohol, sobrepeso u obesidad, una dieta baja en frutas y hortalizas, el sedentarismo, la presencia de enfermedades de transmisión sexual tales como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Virus del Papiloma Humano (VPH), la contaminación del aire urbano y la presencia de humo por la utilización doméstica de combustibles sólidos como la leña (OMS b, 2009).

De acuerdo al estudio realizado por la OMS, es posible prevenir el 30% de los casos de cáncer a través de la disminución de factores de riesgo. Por ello, como resultado de las recomendaciones internacionales, en México se llevan a cabo programas encaminados a los principales tipos de cáncer, a través de estrategias de prevención y detección oportuna, dos ejes fundamentales para disminuir la morbilidad y mortalidad por dicho padecimiento (*op. cit.*).

La Secretaría de Salud (2008) (SSA) reporta la distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo: en las mujeres el cáncer de mama tuvo mayor presencia (8.3%), seguido por leucemia (5.6%), cuello de útero (4.8%), ovario (3.1%) y colon (1.2%). La leucemia afectó principalmente a los hombres (15.2%), seguido por cáncer de próstata (6.0%), tráquea bronquios y pulmón (4.1%) y colon (3.2%) (Cuadro 1) (INEGI, 2009).

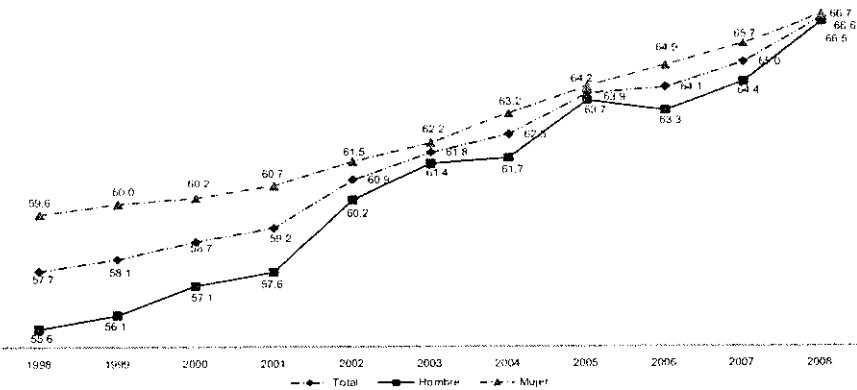
Cuadro 1. Egresos hospitalarios por tumor maligno en el 2008 (tomado de INEGI, 2009).

Tipo de tumor maligno	Total	Hombres	Mujeres
Total	100.0	100.0	100.0
Leucemias	8.7	15.2	5.6
Mama	5.8	0.4	8.3
Cuello del útero	3.3	0.0	4.8
Ovario	2.1	0.0	3.1
Tráquea, bronquios y pulmón	2.0	4.1	1.0
Próstata	1.9	6.0	0.0
Del estómago	1.8	3.1	1.1
Del colon	1.8	3.2	1.2
Higado	1.2	1.9	0.8
Del rectosigmoides, recto y ano	1.1	2.0	0.7
Vejiga	1.0	2.2	0.4
Labio, cavidad bucal y faringe	0.9	1.9	0.5
Páncreas	0.9	1.5	0.7
Cuerpo del útero	0.8	0.0	1.1
Melanoma y otro tumores de la piel	0.5	0.6	0.3
Esófago	0.4	1.1	0.1
Otros	65.8	56.8	70.3

Fuente: SSA, DGIS (2008), Egresos Hospitalarios 2008. Proceso INEGI.

En nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar de 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer incrementó, de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; en las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que en los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes, tomado de INEGI 2009 (Figura 1) (*op. cit.*).

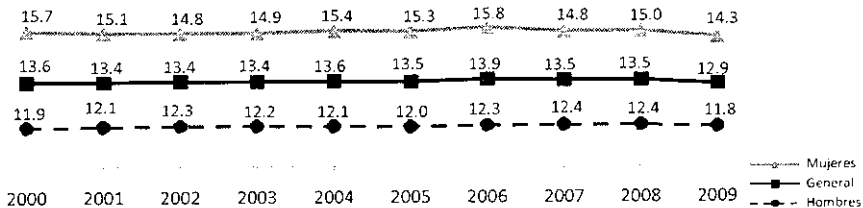
El incremento en dicha tasa es aproximadamente de diez puntos; esta tendencia resulta preocupante por las implicaciones sobre los años de vida perdidos en el proceso de la enfermedad, por la capacidad de las instituciones para dar atención adecuada y oportuna, así como por el impacto que tiene la enfermedad en la familia.



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2008. Bases de datos.

Figura 1. Estadísticas de defunciones por tumor maligno en México 1998-2008 (tomado de INEGI 2009).

En el año 2009 se registraron en Jalisco 37 mil 744 defunciones, 54.6% ocurrieron en hombres y 45.4% en mujeres. Los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de las principales causas de defunción en el estado; por dicha causa fallecieron 4 mil 878 personas, volumen que representa el 12.9% del total de defunciones registradas en el año tomado de INEGI 2009 (Figura 2) (*op. cit.*).



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 2000-2008. Citas preliminares 2009

Figura 2. Defunciones generales por sexo causadas por tumor maligno en Jalisco 2000-2009 (tomado de INEGI 2009).

En los varones, los tumores malignos son la tercera causa de muerte con 2 mil 432 defunciones, lo que significó 11.8% de los fallecimientos en hombres. En las mujeres, también se ubica en el tercer lugar de las principales causas de muerte con 2 mil 446 decesos; es decir el 14.3% de las defunciones en la población femenina (*op. cit.*).

En los varones, de las muertes causadas por tumores malignos en el año, las de mayor incidencia corresponden a los de: próstata (19.1%), tráquea, bronquios y pulmón (14.5%), estómago (7.6%) y de colon (5.0%). En las mujeres, las defunciones por cáncer maligno corresponden al de mama (15.5%), cervico-uterino (9.6%), tráquea, bronquios y pulmón (9.5%) hígado y vías biliares (6.1%), estómago (6.0%) y de colon (5.3%) (*op. cit.*).

Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad en la cual las células del colon o del recto se vuelven anormales y se dividen sin control, por lo que causa un tumor. Las células del CCR invaden y destruyen el tejido a su alrededor, además, pueden desprenderse del tumor y diseminarse para formar nuevos tumores en otras partes del cuerpo (metástasis) (American Cancer Society, 2008).

El CCR representa aproximadamente el 10% de todas las neoplasias y es la segunda causa de muerte por cáncer en los países occidentales, con un estimado de 146,970 nuevos casos y 49,900 muertes en el 2009 en los Estados Unidos (Jemal *et al.*, 2009).

El CCR en México es el cuarto de los tipos más comunes de cáncer en hombres (después de leucemia, cáncer de próstata y de pulmón), y en mujeres es el quinto (después del cáncer de mama, leucemia, cuello de útero y de ovario). Sin embargo el índice de casos nuevos y de muerte por esta enfermedad ha disminuido, debido en gran parte al uso de pruebas que permiten la detección y eliminación de pólipos colorrectales antes de que progresen a CCR (INEGI, 2009).

En Jalisco la incidencia de muertes por CCR ha disminuido en hombres, para el 2008 el total de muertes por tumor maligno colorrectal fue de 5.8% y en el 2009 bajó a 5.0% mientras que en mujeres hubo un incremento, en el 2008 la tasa de defunción fue 4.8% y en el 2009 de 5.3% (*op. cit.*).

Factores de riesgo de cáncer colorrectal

El riesgo de desarrollar CCR aumenta con la edad; el 91% de los casos se diagnostican en personas mayores de 50 años, varios factores se asocian con un mayor riesgo del CCR (American Cancer Society, 2010). Estudios recientes muestran que ciertos factores están ligados a una probabilidad mayor de padecer CCR, como los siguientes:

-
- **Edad.** Es más probable que el CCR ocurra al envejecer, aunque esta enfermedad puede presentarse a cualquier edad, la mayoría de las personas que padecen CCR son mayores de 50 años (Hill *et al.*, 2006).
 - **Antecedentes familiares.** Los familiares cercanos de una persona que ha tenido CCR tienen más probabilidades de padecer este tipo de cáncer, especialmente si el pariente presentó cáncer a una edad joven. Si varios miembros de la familia han tenido CCR, las probabilidades aumentan todavía más (Norat *et al.*, 2005).
 - **Factores genéticos.** Los grupos que tienen incidencia alta de CCR incluyen aquellos con afecciones hereditarias, como la poliposis familiar, el cáncer colorrectal no polipode hereditario (CCNPH) o las variantes I y II del síndrome de Lynch y aquellos con antecedentes personales de colitis ulcerosa o colitis de Crohn (Thorson *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001).

Además, otras afecciones comunes que representan un aumento de riesgo, incluyen los antecedentes personales de CCR o adenomas de pacientes de primer grado, y antecedentes de cáncer de mama, endometrio u ovario (Ransohoff y Lang 1991; Fuchs *et al.*, 1994). Estos grupos de riesgo alto representan solo el 23% de todos los CCR (Winawer *et al.*, 2011).

- **Dieta.** La formación de CCR se relaciona con el consumo de una dieta rica en carnes rojas y procesadas y pobre en consumo de grano integral, frutas y verduras (Koushik *et al.*, 2007).
- **Falta de ejercicio.** Un estilo de vida sedentario puede ser un riesgo mayor de padecer CCR por el contrario, las personas que hacen ejercicio con regularidad pueden tener un riesgo menor de padecerlo (Howard *et al.*, 2008).
- **Tabaquismo.** Los estudios epidemiológicos ofrecen cada vez más evidencia que el fumar cigarrillos, especialmente por largo tiempo, aumenta el riesgo de padecer CCR (Paskett *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2000).

Marcadores tumorales en cáncer colorrectal

El antígeno carcinoembrionario (ACE) es una glicoproteína sérica que se utiliza con frecuencia para la detección de pacientes con CCR, un estudio sobre el uso de este marcador tumoral indica lo siguiente (American Society of Clinical Oncology, 1996):

- El análisis de la concentración del ACE no es una prueba contundente para la detección selectiva del CCR, debido a que arroja un gran número de resultados falsos positivos y falsos negativos.
- La prueba pos-operatoria del ACE se debe restringir a pacientes aptos para someterlos a la extirpación de metástasis en el hígado o el pulmón.
- No se debería recomendar el uso rutinario de la concentración del ACE solamente para observar la respuesta al tratamiento.

Existen métodos de vigilancia, como la inmunocentellografía del ACE (Lechner *et al.*, 2000) y la tomografía por emisión de positrones (Lonneux *et al.*, 2002) que se encuentran bajo evaluación clínica. Como se mencionó, el marcador más utilizado es el ACE, sin embargo, debido a la ausencia de sensibilidad para la enfermedad temprana, tiene poco valor en su identificación en etapas clínicas iniciales. La baja sensibilidad y especificidad, en combinación con la baja prevalencia del CCR en poblaciones asintomáticas impide que se emplee como prueba de escrutinio o tamizaje. Aun así en personas con síntomas apropiados, una elevación significativa del ACE debe considerarse como indicativa de cáncer (Instituto Nacional de Cáncer, 2010).

Estadios del cáncer colorrectal

El AJCC (*American Joint Committee of Cancer*) por sus siglas en inglés citado por Rice *et al.*, (2010) designó la estadificación mediante la clasificación de Tumor Primario (T), Ganglios linfáticos regionales (N), Metástasis a distancia (M), para definir el CCR, la misma clasificación se usa tanto para la estadificación clínica como patológica.

Definiciones TNM

Tumor Primario (T)

- TX. No puede evaluarse el tumor primario
- T0. No hay prueba de tumor primario
- Tis. Carcinoma *in situ*: intraepitelial o invasión de la lámina propia*

-
- T1. El tumor invade la submucosa
 - T2. El tumor invade la muscular propia
 - T3. El tumor invade a través de la muscular propia hacia los tejidos pericorrecetales.
 - T4. El tumor invade directamente otros órganos o estructuras o perfora el peritoneo visceral o ambos **,***

* Tis incluye las células cancerosas confinadas a la membrana glandular basal (intraepitelial) o a la lamina propia (intramucosa) sin extensión a través de las mucosas musculares a la submucosa.

** La invasión directa en T4 incluye la invasión de otros segmentos colorrectales por vía serosa; por ejemplo, la invasión del colon sigmoideo por un carcinoma del ciego.

*** El tumor adherente macroscópicamente a otros órganos o estructuras, se clasifica como T4. Sin embargo, si no hay tumor presente en la adherencia, microscópicamente, la clasificación deberá ser pT3.

Ganglios linfáticos regionales (N)

- NX. No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales
- N0. No hay metástasis de los ganglios linfáticos regionales
- N1. Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos regionales
- N2. Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales

Un nódulo tumoral en el tejido adiposo pericorrecetal de un carcinoma primario sin prueba histológica de ganglio linfático residual en el nódulo, se clasifica en la categoría pN como metástasis de ganglio linfático regional si el nódulo tiene la forma y el contorno uniforme de un ganglio linfático. Si el ganglio tiene un contorno irregular debe clasificarse en la categoría T y codificarse como V1 (invasión venosa microscópica) o como V2 (si es macroscópicamente evidente), ya que hay una gran probabilidad de que represente infiltración venosa.

Metástasis a distancia (M)

- MX. No puede evaluarse la metástasis a distancia
- M0. No hay metástasis a distancia
- M1. Hay metástasis a distancia

Agrupación por estadios del AJCC

Estadio 0

- Tis, N0, M0

Estadio I

- T1, N0, M0
- T2, N0, M0

Estadio IIA

- T3, N0, M0

Estadio IIB

- T4, N0, M0

Estadio IIIA

- T1, N1, M0
- T2, N1, M0

Estadio IIIB

- T3, N1, M0
- T4, N1, M0

Estadio IIIC

- Cualquier T, N2, M0

Estadio IV

- Cualquier T, cualquier N, M1

En el presente estudio se trabajó con un modelo murino de cáncer colorrectal inducido con el compuesto carcinogénico 1,2-dimetilhidracina (DMH) en el laboratorio de Biomarcadores Moleculares (DBCM CUCBA-UDG). La DMH administrada semanalmente a dosis de 20 mg/kg de peso, induce el cáncer colorrectal después de 20 a 24 semanas de tratamiento. Según los resultados reportados en Cazares (2010), a la semana 31 los ratones tratados con la DMH se encuentran en el Estadio I en la clasificación del AJCC. Sin embargo no se puede comentar sobre los estadios más avanzados del CCR ya que el trabajo de Cazares (2010), se limitó al estudio histopatológico del colon distal con base en la literatura existente que reporta la presencia de lesiones preneoplásicas (focos de criptas aberrantes) características del proceso de carcinogénesis del colon tanto en humano como en modelos murinos (Di Gregorio *et al.*, 1997).

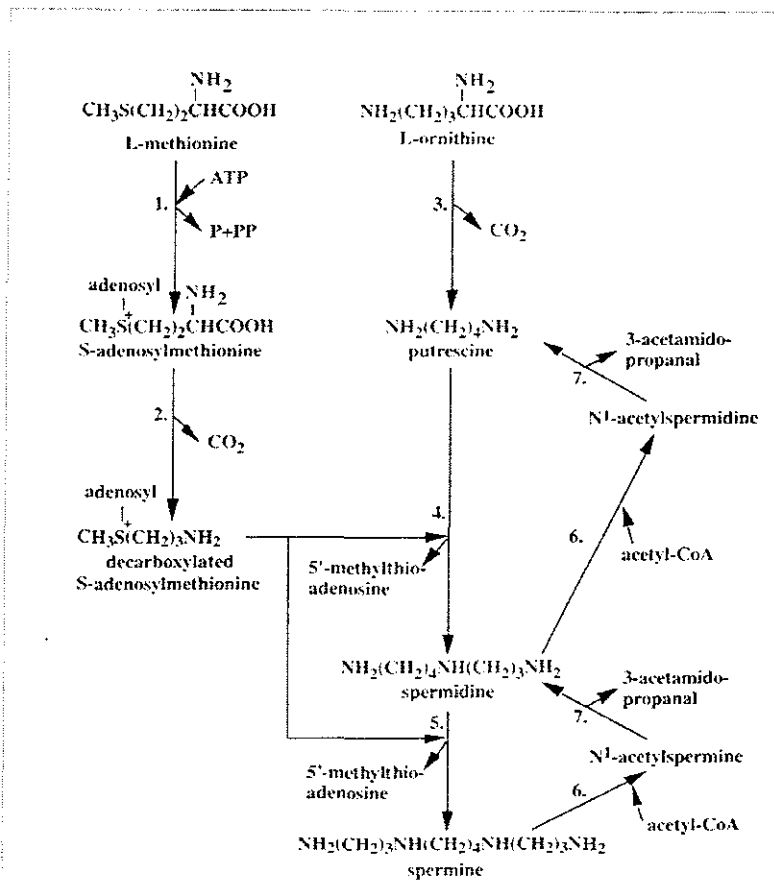
Aun con los avances antes mencionados, se requiere de modelos experimentales y de moléculas biomarcadoras del desarrollo de CCR. Las poliaminas (PAs) juegan un

papel importante en el CCR, esto se ha confirmado en estudios donde encuentran concentraciones elevadas de estas biomoléculas en pacientes con carcinoma de colon (Loser *et al.*, 1990).

Poliaminas

Las PAs son biomoléculas policatiónicas alifáticas que se encuentran en casi todas las células vivas (Wallace y Caslake 2001). Las principales PAs biogénicas son espermidina y espermina y su precursor es la putrescina. Su carga positiva a pH neutro, distribuida a lo largo de la molécula, facilita su interacción con moléculas aniónicas como los ácidos nucleicos (Matthews, 1993). La mayoría de los organismos vivos son capaces de sintetizar los precursores de PAs como los aminoácidos arginina y metionina (Davis *et al.*, 1992; Marton y Pegg 1995; Morgan 1999).

Las vías metabólicas de la síntesis y la interconversión de las PAs son bien conocidas. Los primeros pasos comprometidos con la biosíntesis de las PAs son las descarboxilaciones de la ornitina para formar putrescina, CO₂ y de la S-adenosilmetionina para formar S-adenosilmetionina descarboxilada. Estas reacciones irreversibles son catalizadas por la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC, EC 4.1.1.50), respectivamente, tomado de Kilpeläinen, 2002 (Figura 3).



Fuente: Kilpeläinen 2002.

Figura 3. Biosíntesis y conversión de las PAs. Las enzimas que catalizan reacciones son: 1. ATP: L-metionina S-adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6), 2. S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50), 3. Ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17), 4. Espermidina sintasa (EC 2.5.1.16), 5. Espermina sintasa (EC 2.5.1.22), 6. Espermidina/espermina N₁-acetiltransferasa (EC 2.3.1.57), y 7. Poliamina oxidasa (EC 1.4.3.4) (tomado de Kilpeläinen, 2002).

Se han atribuido diferentes funciones a la PAs (putrescina, espermidina y espermina) por ser cationes polivalentes orgánicos que se unen a varios aniones celulares, como el DNA, RNA, proteínas, polisacáridos y fosfolípidos. Se considera un papel importante en la replicación, la transcripción y la traducción. Las PAs son esenciales para el crecimiento y diferenciación de las células eucariotas y en consecuencia niveles elevados de PAs son

indispensables para la transformación neoplásica y la proliferación celular (Kucharzewska *et al.*, 2010).

Ornitina descarboxilasa (ODC)

La ornitina descarboxilasa es la principal enzima que regula la vía biosintética de las PAs, estas se han utilizado como marcadores universales de proliferación celular en pacientes con leucemia, linfoma y con cáncer de glándula mamaria, ya que se detectan durante etapas tempranas de proliferación celular (Morgan, 1999). La ODC de mamífero es un dímero altamente conservado formado de subunidades idénticas de peso molecular de 51 kDa. Esta enzima cataliza el primer paso en la vía biosintética de las PAs que forma putrescina, la cual se convierte en espermidina y espermina.

La ODC tiene una vida media muy corta, en un rango de 20 a 60 minutos, lo que representa la vida media más corta de todas las enzimas estudiadas recientemente, lo que ha estimulado el interés por esta enzima, ya que sugiere un papel regulador (Schipper y Verhofstad, 2002). La expresión de la ODC es inducible, en respuesta a una gran variedad de estímulos de crecimiento, tales como hormonas, factores de crecimiento, estímulos regenerativos y promotores de tumores. La característica más importante de la ODC, es su rápido recambio que es un reflejo de su regulación, ya sea por los cambios en la velocidad de síntesis, por estímulos de crecimiento, o cambios en la velocidad de degradación, en respuesta a niveles intracelulares de las PAs (Pegg, 2006).

Estructura y actividad de la ODC

La ODC es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor, la ODC es activa como homodímero y presenta dos sitios activos. El monómero contiene dos dominios, el cofactor se une al dominio N-terminal. Los sitios activos de la enzima se forman en la interface del dímero, entre el dominio N-terminal de una subunidad y el dominio C-terminal de la otra (Coleman *et al.*, 1994). La asociación entre las subunidades es débil; de tal forma que bajo condiciones fisiológicas los dímeros se encuentran en un rápido equilibrio con los monómeros inactivos. La mutación del aminoácido Cys₃₆₀ a Serina o Alanina produce una fuerte disminución de la actividad de la ODC. La difluorometilornitina (DFMO), es una molécula sintética que se utiliza como inhibidor de la ODC y actúa de manera irreversible así forma un enlace covalente con Cys₃₆₀ he inhibe la actividad de la misma (McCann y Pegg, 1992).

La actividad de la ODC es regulada a través de cambios en la cantidad intracelular de la enzima. La regulación de la proteína ocurre a tres niveles: transcripcional, traduccional y postraduccional (Almud *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2004).

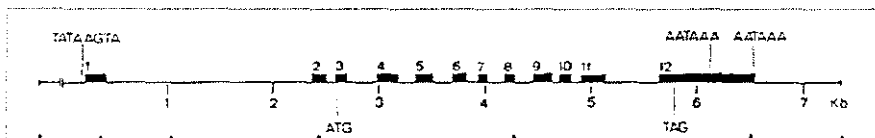
Degradación de la ODC

Se requiere la asociación no covalente de la ODC con una proteína denominada antizima para su degradación por el proteasoma 26 S. La antizima favorece la interacción de la ODC con el proteasoma e incrementa su degradación. La degradación inicia en el extremo C-terminal, con la delección de 37 residuos que le confieren estabilidad a la ODC aún en presencia de antizima. Entre estos residuos la Cys₄₄₁ es clave para la degradación (Hayashi y Marakami, 1995).

La antizima se sintetiza en respuesta a un incremento en la concentración de las PAs. La antizima se une fuertemente al monómero ODC y forma un heterodímero (ODC-antizima), lo que impide la formación de homodímeros de la ODC e inhibe su actividad. Es probable que la débil asociación de las subunidades de la ODC favorezca la interacción con la antizima (Coffino, 2001) y su degradación a través del proteosoma 26 S. La síntesis de la antizima es regulada principalmente a nivel traduccional. Los RNAm de la antizima contienen dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) solapados, el ORF1 es corto y el ORF2 es más largo y no contiene codón de iniciación. La síntesis de la antizima requiere de la traducción de ambos ORFs. La lectura de OFR2 por el ribosoma ocurre cuando por un error la traducción no termina en el extremo final de ORF1, de tal forma que continúa con la secuencia de OFR2. Este error en la lectura de los RNAm es estimulado por las PAs. La concentración de la antizima se incrementa cuando los niveles de PAs aumentan (Mangold, 2005; Ivanov *et al.*, 2000). Sin embargo, la síntesis de la antizima también es regulada transcripcionalmente, ya que una disminución en la concentración de PAs a través de DFMO, produce una reducción en los RNAm de la antizima. La degradación de la antizima también es inhibida por las PAs. De tal manera que altos niveles de PAs incrementan la síntesis de la antizima y reducen su degradación. La espermidina y la espermina son más efectivas que la putrescina en la estimulación de la traducción de los RNAm de la antizima (Nilsson *et al.*, 1997).

Regulación transcripcional de la ODC

Muchos factores incrementan la síntesis los RNAm de la ODC. El promotor del gen *Odc* contiene múltiples secuencias que responden a hormonas, factores de crecimiento y factores promotores de tumores, tomado de Katz y kahana 1988 (Figura 4). Se conoce que *Odc* es blanco del oncogen *c-myc* y que el incremento en la actividad del complejo de transcripción *Myc/Max* produce un incremento en la ODC (Zhao y Butler, 2001; Qin *et al.*, 2004). El promotor del gen *Odc* contiene dos cajas E con las secuencias CACGTG que se unen al factor de la transcripción *Myc/Max* y se activan cuando los niveles de *c-Myc* se incrementan. En células en reposo, estos sitios se encuentran ocupados por el complejo *Mnt/Max* y la transcripción de *Odc* es muy baja (Packham y Cleveland, 1997; Nilsson *et al.*, 2004).



Fuente: Katz y kahana 1988

Figura 4. Estructura del gen *Odc* en ratón. Los exones se indican en forma de cajas con su número en la parte superior, los números por debajo de la línea representan la longitud en pares de kilobases. Se señala además la posición de la caja TATA, del codón de iniciación ATG, del codón de terminación TAG, y de las dos señales de poliadenilación AATAAA tomado de Katz y kahana 1988.

Existe un polimorfismo en el intron 1 del gen *Odc* humano el cual consiste en una variación A/G en la posición 317 (O'Brien *et al.*, 2004). Este sitio se encuentra localizado entre las dos cajas E a cinco nucleótidos de la segunda secuencia y el cambio puede afectar la unión del complejo *Myc/Max*. Se ha demostrado que el promotor *Odc* con el alelo A es más activo que el alelo G. Los alelos A y G representan el 24% y el 76% respectivamente, en población caucásica. Así, los individuos pueden presentar diferencias en la concentración de la ODC como respuesta a un aumento en la expresión de *Myc*. Estas diferencias pueden influir en la susceptibilidad a cáncer de colon y cáncer de próstata (Martínez *et al.*, 2003).

Regulación traduccional de la ODC

La ODC puede ser regulada a nivel traduccional; el RNAm de la ODC contiene una larga región en el extremo 5' que no se traduce (5'-UTR) (275-313 nucleótidos en mamíferos), pero que le confiere determinada estructura secundaria. Por lo tanto, la traducción es fuertemente estimulada por niveles altos del factor de iniciación eIF-4E de tal forma que las células que sobre-expresan eIF-4E presentan un alto contenido de ODC. Además un ORF corto y una secuencia rica en GC localizados dentro del extremo 5'-UTR son elementos que intervienen durante la inhibición de la traducción de la ODC tanto *in vivo* como *in vitro* (Kozak, 1989; Gray y Henze 1994).

Numerosos estudios han mostrado que se requiere de PAs para la traducción de la ODC, sin embargo un exceso de estas moléculas inhibe el proceso de traducción de esta enzima. Aunque aún no es claro el mecanismo que determina la sensibilidad de la ODC a una alta concentración de PAs, es posible que ésta se deba a alteraciones en el proceso de la degradación de la enzima (Lövkvist *et al.*, 2001). Es importante señalar que la ODC no solamente se encuentra controlada por el oncogen *c-myc* sino que también el oncogen *ras* regula su expresión. La activación de la vía Ras tiene un efecto estimulante tanto en la transcripción del gen *Odc* como en la traducción de los RNAm. El principal efecto de Ras es en la traducción y este es mediado a través de cambios en la fosforilación del complejo formado por eIF-4E y la proteína eIF-4E-BP1 (Shantz, 2004).

Distribución de la ODC en tejidos

El interés por el estudio de la ODC inició tras la observación del dimorfismo del riñón en ratón y muchas otras especies, ya que este órgano es generalmente más grande en machos que en hembras. El tratamiento de hembras con la hormona testosterona, u otros esteroides androgénicos, incrementan el tamaño del riñón y promueve la expresión de múltiples genes, que incluyen también la ODC. En los años 80's se realizaron números estudios sobre la expresión de la ODC a nivel de transcripción y traducción en riñón de ratones hembras y machos castrados tratados con testosterona (el andrógeno biológicamente activo en tejido renal de ratón). Se comprobó que la diferencia en el tamaño del riñón entre sexos estaba relacionada con la presencia de receptores a andrógenos en la superficie de las células (Jänne *et al.*, 1984). Los datos experimentales indican que, en condiciones basales, la actividad enzimática de la ODC es 12 veces más alta en machos en comparación con hembras, mientras que la concentración del RNAm es 5 veces más elevada en machos que en hembras. Así, la inducción de esta enzima en

el riñón de ratón es altamente específica y dependiente de receptores para los andrógenos.

Además de su corto tiempo de vida media en un rango de 20 a 60 minutos (Schipper y Verhofstad, 2002), la ODC se caracteriza por representar un porcentaje muy bajo de las proteínas totales de la célula. Solamente del 0.03 al 0.05% de las proteínas solubles totales corresponden a la ODC aun después de su inducción en riñón con estímulos (Janne *et al.*, 1984) tales como: hormonas factores de crecimiento, toxinas y carcinógenos (Kontula *et al.*, 1984; Berger *et al.*, 1984; Brabant *et al.*, 1988). Por lo anterior, múltiples estudios del gen *Odc* se han realizado en riñón de modelos murinos, tras la inducción de su expresión con andrógenos.

Por lo anterior el riñón es un órgano blanco adecuado para el estudio de la expresión de la ODC como biomarcador de eventos celulares. Además de que es el órgano con la concentración más alta de ODC, se destaca que es preferible utilizar riñón de ratones hembra para descartar el efecto de estímulos hormonales que existen en machos (Levillain *et al.*, 2005).

Modelos murinos de CCR

Los modelos murinos químicos de CCR han contribuido significativamente a comprender la importancia de los factores ambientales en esta patología, facilitan el estudio del efecto de agentes preventivos y el avance en la búsqueda de alternativas terapéuticas. Diversos laboratorios han implementado modelos animales de CCR con DMH o su derivado azoximetano, sin embargo, debido a la heterogeneidad de los datos reportados en la literatura, fue importante estandarizar un modelo experimental de CCR en ratones Balb/c en las condiciones de nuestro laboratorio (Cazarez, 2010). El modelo consiste en la administración semanal subcutánea de DMH a una dosis subletal de 20 mg/Kg de peso corporal; la manipulación de la DMH se realiza en campana de extracción, el carcinógeno se pesa al momento de la inyección y se disuelve en solución salina (200 μ L/ratón). El estudio histopatológico, con hematoxilina-eosina de la porción distal de colon ha demostrado que a partir de la semana tres el colon de los ratones presentaba alteraciones iniciales (típicamente inflamación) y que estos daños se agravaban de manera progresiva en relación con el tiempo de inducción. Por ejemplo a partir de la semana siete, el colon de los ratones presentan los primeros signos atípicos; a la semana 24 se visualizan las primeras displasias mientras que a la semana 31 el desarrollo tumoral es muy obvio con presencia de adenocarcinoma intramucoso y evidencia de displasia (*op. cit.*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de colorrectal (CCR) representa un serio problema de salud pública en México, es la segunda causa de muerte por cáncer y la cuarta más frecuente dentro de la patología oncológica en la población general. Actualmente no existe un tratamiento 100% eficaz, para el CCR y los disponibles son agresivos y no son selectivos.

La evaluación de tratamientos alternativos requiere de modelos experimentales de CCR y de moléculas biomarcadoras de su desarrollo. Se ha reportado la utilidad de las PAs y la actividad de la ODC como biomarcadores del desarrollo tumoral ya que los niveles de estas moléculas incrementan en diversos tipos de cáncer de tejido epitelial. En el modelo murino de cáncer de colon inducido con DMH se ha comprobado que los niveles de las PAs urinarias son biomarcadores del desarrollo tumoral, sin embargo, es necesario complementar el estudio a través de la evaluación de la expresión de la ODC, la enzima limitante del metabolismo de las PAs en este mismo modelo.

JUSTIFICACIÓN

Para entender los mecanismos involucrados en la patología del CCR se requiere de moléculas biomarcadoras de su desarrollo. Los niveles de PAs se incrementan en diversos tipos de cáncer y la ODC es la enzima limitante del metabolismo de las PAs, por lo que podría ser un buen marcador del desarrollo del CCR.

Con el objeto de valorar la utilidad de la ODC como marcador del desarrollo del CCR, es importante estudiar su expresión en tejidos de ratones Balb/c tratados con DMH. Debido a la complejidad de la regulación de la actividad de la enzima es necesario analizar su expresión a nivel transcripcional y traduccional.

HIPÓTESIS

La expresión de la ornitina descarboxilasa (ODC), se incrementa durante el desarrollo de cáncer de colon en ratones Balb/c tratados con 1,2-dimetilhidracina (DMH).

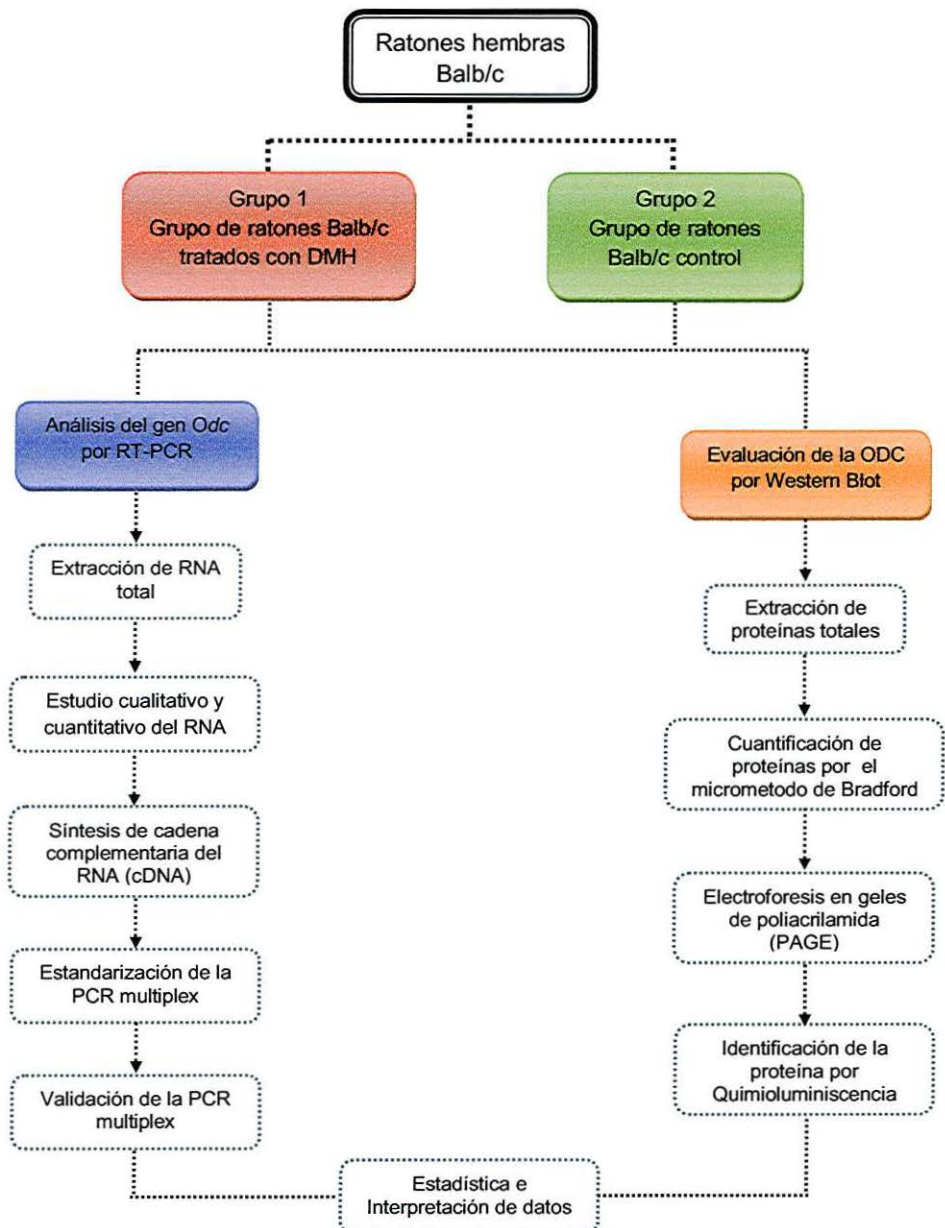
OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en un modelo murino Balb/c de cáncer de colon.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer las técnicas de RT-PCR y Western Blot para el estudio de la expresión de la ODC en riñón y colon de ratones Balb/c tratados con DMH y control.
- 2) Analizar la transcripción del gen *Odc* en riñón y colon de ratones Balb/c tratados con DMH y control por RT-PCR.
- 3) Evaluar la expresión de la enzima ODC en riñón y colon de ratones Balb/c tratados con DMH y control por Western Blot.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se trabajó con hembras de 18 a 20 g de peso corporal de la cepa Balb/c, colocadas en jaulas en bioterio a temperatura de 22 a 24°C, humedad constante y fotoperiodo controlado de 12 horas luz y 12 horas oscuridad; se alimentaron con dieta comercial (Purina) que cubre los requerimientos nutricionales básicos.

Grupos de estudio

Nuestro grupo de trabajo estableció el modelo murino Balb/c de CCR inducido con DMH (Cazares, 2010) en el laboratorio de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular.

El cáncer se indujo con DMH preparado al momento del experimento en solución salina isotónica, a una dosis subletal de 20 mg/kg de peso corporal; inyectado subcutáneamente en la parte ventral de cada ratón, semanalmente durante 24 semanas, y posteriormente se sacrificaron a la semana 31. El grupo control consistió en ratones que recibieron inyecciones subcutáneas semanales de solución salina isotónica durante 24 semanas y posteriormente se sacrificaron a la semana 31.

Análisis de la expresión de la *Odc* por RT-PCR semicuantitativa

Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó en frío y en campana de flujo laminar (Novatek) bajo condiciones libres de RNAasas. Se anestesió el ratón subcutáneamente con 200 µL de pentobarbital sódico al 0.065% de la marca Aranda, se extrajo el riñón y el colon, en condiciones asépticas los cuales se congelaron a -80°C hasta su uso. Para la extracción de RNA se utilizó 40 mg de cada tejido mismo que se lavó con H₂O MilliQ tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%. Posteriormente se agregó a cada una de las muestras 1 mL de Trizol (Invitrogen) y se homogenizó vigorosamente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 6°C en una microcentrifuga y se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf. Se incubó cada muestra durante 5 min a 25°C, se añadió 200 µL de cloroformo al 100% (Sigma) y se agitó el tubo durante 15 seg. Posteriormente se incubó 3 min a 25°C, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 6°C. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo, se precipitó el RNA con 500 µL de isopropanol al 100%

(Sigma), se incubó durante 10 min a 25°C, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 6°C y se retiró el sobrenadante. El RNA formó una pastilla, se lavó con 1 mL de etanol al 75% (Sigma) y se agitó vigorosamente, se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min a 6°C, se retiró el etanol y se secó el RNA en campana de flujo laminar.

Finalmente se re suspendió el RNA en 50 μ L de H₂O MilliQ tratada con DEPC y se incubó durante 10 min a 55°C en baño maría, se regresó rápidamente a hielo y se congeló a -80°C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

Análisis de la calidad de RNA total

Se aplicó 3 μ L de RNA total más 2 μ L de amortiguador de carga (6x), en cada pozo en gel de agarosa al 1% preparado con solución TBE 1x pre-corrido 1hr/50volts en una cámara de electroforesis (BIO-RAD). Se corrió a 75 volts durante 60 min, se tiñó el gel con bromuro de etidio preparado a una concentración de 20 ng/mL y se observó en un transluminador de luz UV (UVP modelo M-20E) (*op. cit.*). Se tomó una fotografía con una cámara Kodak digital Science.

Determinación de la concentración del RNA total

Se cuantificó el RNA total con un espectrofotómetro (SpectroUV-VISRS modelo UV-2500) a una longitud de onda de 260 nm a una dilución 1:60. El valor de la densidad óptica obtenido a 260 nm se dividió con el obtenido a 280 nm para la evaluar la calidad del RNA total. La concentración del RNA (ng/ μ L) se obtuvo al multiplicar el valor de la densidad óptica por 40 (valor constante) por 60 (factor de dilución).

Síntesis de cDNA a partir de RNA total

El protocolo se elaboró según recomendaciones del proveedor (Invitrogen), todos los reactivos fueron agregados a un tubo para reacción de PCR y las incubaciones se realizaron en un termociclador (MJ Research modelo PTC-100).

Se agregó 1 μ L de oligo (dT) 12-18 (500 μ g/mL), 1000 ng de RNA total, 1 μ L de mezcla de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTPs) a 10 mM y se ajustó el volumen a 12 μ L con agua estéril tratada con DEPC. Se calentó la mezcla a 65°C/5min y rápidamente se pasó a una cama de hielo, se centrifugó brevemente la mezcla y se agregó 4 μ L de amortiguador First-Strand 5X, 2 μ L de ditiotreitól (DTT) 0.1 M y 1 μ L de RNaseOUT™ (Inhibidor de ribonucleasa recombinante (40 unidades/ μ L), se mezcló el contenido del tubo y se incubó a 37°C por 2 min. Se agregó 1 μ L (200 unidades) de M-MLV-RT, se

mezcló con la micropipeta y se incubó a 37°C por 50 min. Se inactivó la reacción al incubar a 70°C por 15 min y finalmente se guardó a -20°C hasta su uso (*op. cit.*).

Diseño de cebadores para cDNA

A partir de las secuencias de *Odc* y β -*actina*, que se encontraron en la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y con las herramientas de bioinformática (Rozen y Skaletsky, 2000) se elaboraron los cebadores para la retrotranscripción del fragmento del gen de interés (*Odc*) y del fragmento del gen constitutivo (β -*actina*). Para validar los cebadores se utilizaron los programas de libre acceso, Autodimer (Vallone y Butler, 2004) y NCBI/BLAST/blastn proporcionado por NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Uno de los criterios para el diseño de los cebadores fue que las temperaturas de alineación con el cDNA molde estuvieran dentro de un mismo rango de temperatura para su coamplificación por PCR. Los cebadores fueron sintetizados por Uniparts S.A. de C.V.

Estandarización de PCR multiplex

Se estandarizó la PCR multiplex del fragmento del gen *Odc* al utilizar como constitutivo a la β -*actina* en las condiciones de nuestro laboratorio. Para determinar las condiciones de PCR se consideraron varios parámetros como son la temperatura de alineación, la concentración de cloruro de magnesio, concentración del amortiguador y proporción de cebadores, y concentración de *Taq* polimerasa. Cada experimento de PCR incluyó un control negativo el cual consiste en agregar todos los componentes de la PCR menos el cDNA y para minimizar la variabilidad en la preparación de la mezcla de reacción, solo 12 muestras fueron analizadas en una sola determinación de PCR (Ailenberg y Silverman, 1997).

Validación de RT-PCR multiplex

La validación de la prueba se realizó después de identificar las condiciones ideales para la coamplificación de *Odc* y β -*actina* se validó la prueba. El primer paso fue la optimización de la concentración de cebadores, enseguida se determinó la cantidad ideal de RNA, se optimizó el número de ciclos de PCR así como la reproducibilidad de la reacción RT-PCR.

Cuantificación de los productos de PCR

Para evaluar los productos de PCR, se elaboraron geles de agarosa al 1.5% en solución de TBE 1X. Cada muestra se aplicó por cuadruplicado y se separó por electroforesis a 75 V por 120 min, se utilizó un marcador de 100 pb (Invitrogen). Una vez separadas las muestras, el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 20 ng/mL y se observó en un transluminador de luz UV (UVP modelo M-20E). Se tomó una fotografía con una cámara de Kodak digital Science, el gel se analizó con el programa Kodak EDAS 3.5 (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*).

Determinación de la intensidad de las bandas

La intensidad de las bandas de la *Odc* se obtuvo en píxeles con el programa EDAS 3.5 y los valores fueron ponderados con respecto a la intensidad de las bandas de la β -*actina*, se realizaron cuatro replicas.

Análisis estadístico

Los valores de intensidad se pasaron a una hoja de Excel y se calculó el coeficiente de variación (CV) en porcentaje entre las replicas, un valor inferior a 10%, indica que el proceso experimental es adecuado y reproducible de acuerdo con (Ailenberg y Silverman, 1997; Willey *et al.*, 2002 y Joyce, 2002). Además se aplicó una distribución de *f* de Fisher para comparar las varianzas de cada grupo, y se utilizó la prueba de *t* Student para medir las medias entre los grupos de estudios. Se estableció que una $p < 0.05$ representa a una diferencia significativa entre grupos.

Evaluación de la expresión de la ODC por Western Blot

Preparación de las muestras

Para la extracción de proteínas se utilizaron 30 mg de riñón y colon, los tejidos se lavaron con solución salina. Las muestras se trituraron y lisaron sobre hielo durante 15 min, con 1 mL de amortiguador de lisis que contiene inhibidor de proteasas y fosfatasa de la marca Santa Cruz (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, NaF 10 mM, NaVO₄ 1 mM, NP40 0.5%, tritón X-1001%, PMSF 10 mg, aprotinina 2 µg, leupeptina 5 µg), se utilizó un homogenizador Ultra-Turrax (IKA). Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se descartó la

pastilla y finalmente se guardó a -20 °C hasta su uso (Hames y Rickwood, 1998; Harlow y Lane, 1999; Bolt y Mahoney, 1997).

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas totales de las muestras experimentales se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva de referencia con albumina de suero bovino (BSA). Las muestras experimentales se diluyeron 1:10 con solución de Bradford, se analizaron después de 5 min en un espectrofotómetro (LaboMed) a una longitud de onda de 595 nm. Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra en relación a la curva estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Se prepararon los geles de poliacrilamida (Sigma) en dos partes: el gel inferior al 12.5% de acrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 29:1 Tris base 2 M pH 8.8, persulfato de amonio 1.5%, SDS 10% TEMED 10%) y gel superior al 4% de acrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 29:1, Tris HCl 0.5 M, pH 6.8; persulfato de amonio 1.5%, SDS 10% TEMED 10%). Se colocaron en una cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD), se adicionó una solución amortiguadora (Tris base 0.0248 M, glicina 0.19 M, SDS 10%, pH 8.3).

A cada muestra se le añadió amortiguador de carga en proporción 1:1 (SDS 4%, mercaptoetanol 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.004%, Tris HCl 0.5 M pH 6.8). Las muestras, se calentaron a 100°C durante 5 min, se enfriaron a 4°C durante 1 min, se agitaron vigorosamente y finalmente se cargaron. En el gel la separación se llevó a cabo durante 2 h a 100 V. Para analizar el tamaño de las proteínas se utilizó un marcador de peso molecular de 10-225 kDa (Promega).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (metanol 45%, Coomassie brilliant blue R-250 0.1% y ácido acético 10%) y se lavó el exceso en agitación con una solución decolorante (ácido acético 10% y metanol 10%) (Hames y Rickwood, 1998; Harlow y Lane, 1999; Bolt y Mahoney, 1997). Con el objetivo de seleccionar la concentración de proteínas totales que produjera el mejor patrón electroforético, se utilizaron muestras de 25, 50, 75 y 100 µg de extracto proteico.

Identificación de proteínas por Western Blot

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (*Polivinilidenedifloride*, Millipore). La membrana fue sumergida por 10 min en metanol absoluto (Fermont) y lavada con agua desionizada, de igual manera la almohadilla de fibra, papel filtro y el gel se sumergieron en el amortiguador de transferencia. El gel se colocó en la cámara de electrotransferencia; se agregó amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% a pH 8.3) Se realizó la transferencia durante 3 horas en frío, finalmente la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (ácido acético al 5%, rojo de Ponceau al 0.5%) para comprobar la transferencia (Akhaven-Tafti *et al.*, 1994; Isacsson y Watermark, 1974; Towbin y Gordon, 1984).

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con solución de caseína al 5% y Tween 20 al 0.1% en TBS (Tris-HCl 1 M pH 7.6, NaCl 0.13 M) durante 1 h. Una membrana se expuso con el anticuerpo primario de la ODC (Sigma) a una dilución de 1:200 en TBS-T (TBS con Tween 20 al 0.1%), otra membrana se expuso con el anticuerpo primario de la β -actina (Santa Cruz) a una dilución de 1:8000 en TBS-T. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces (15 min cada una) en TBS-T. Posteriormente se expusieron con el anticuerpo secundario (IgG-HRP) a diluciones de 1:50,000 para la ODC y 1:10,000 para la β -actina. Se utilizó un anticuerpo secundario de la marca Sigma en el caso de la ODC y Santa Cruz para la β -actina.

La detección de las proteínas se realizó en cuarto oscuro, se utilizó luz roja de seguridad. Se utilizó el método de detección quimioluminiscente ECL de GE Healthcare. Se les agregó la mezcla de detección (2 mL de solución A ECL + Plus y 50 μ L de solución B ECL + Plus) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se expusieron a una película de rayos X (Hyperfilm ECL) por 15 seg, se sumergió en solución reveladora durante 1 min se enjuagó en agua desionizada por 30 seg y se sumergió en solución fijadora durante 1 min, posteriormente se volvió a enjuagar y finalmente se observaron las bandas de interés (*op. cit.*).

RESULTADOS

Diseño de cebadores para cDNA

A partir de las secuencias *Odc* y β -*actina*, que se encontraron en la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y con las herramientas de bioinformática (Rozen y Skaletsky, 2000) se elaboraron los cebadores para la amplificación de ambos fragmentos (Cuadro 2). Para validar los cebadores se utilizaron los programas de libre acceso, Autodimer (Vallone y Butler, 2004) y NCBI/BLAST/blastn proporcionado por NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Cuadro 2. Cebadores utilizados para la amplificación de la *Odc* y β -*actina*

Secuencia de referencia	Cebador sentido Cebador antisentido	Temperatura de alineación teórica	Tamaño teórico de producto
NM_013614.2	TTTCCACCACTCCAAGAAGG	60.08	659 pb
<i>Odc</i>	GTTCCAAGAGAAGCCTGCTG	60.13	
NM_007393.3	ACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT	60.69	566 pb
β - <i>actina</i>	GAGAGCATAGCCCTCGTAGATG	60.38	

Estandarización de la PCR multiplex

La estandarización de la PCR consistió en optimizar los siguientes parámetros: temperatura de alineación, concentraciones de cloruro de magnesio, de amortiguador, de cebadores y de *Taq* polimerasa para la coamplificación de ambos fragmentos de los genes. En la figura 5 se muestra un collage de las electroforesis representativas para los diferentes parámetros analizados.

Temperatura:

Se optimizó la temperatura de alineación en un rango de 62°C hasta 67°C. La temperatura óptima fue la de 66°C tanto para *Odc* (659 pb) como β -*actina* (566 pb) ya que a esta temperatura se observa una banda bien definida del tamaño esperado para cada uno de los fragmentos del gen. En la figura 5 A se observa las muestras 1, 3, 5 y 8 la amplificación del fragmento *Odc* y en las muestras 2, 4, 6 y 7 la β -*actina*. Se utilizó un marcador molecular de 100 pb.

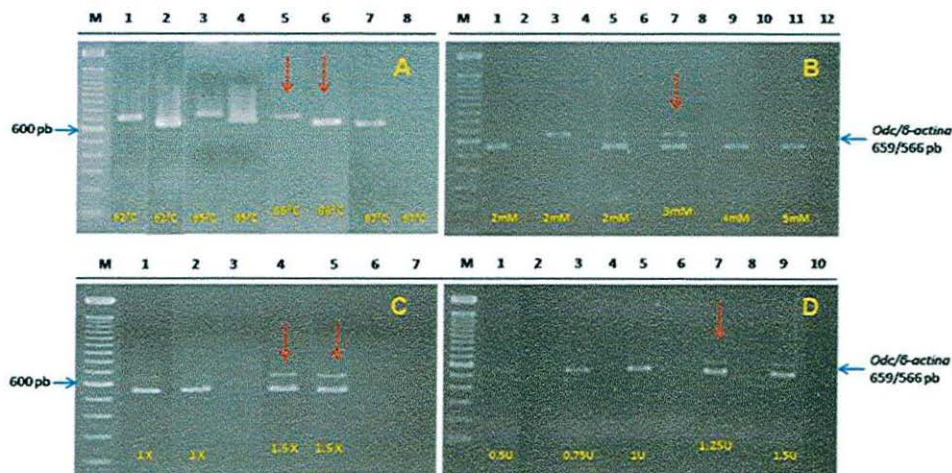


Figura 5. Optimización de los parámetros de PCR multiplex. Electroforesis representativas en gels de agarosa (1.5%), de los productos de PCR A) Temperatura de alineación, B) Cloruro de magnesio C) Amortiguador D) *Taq* polimerasa.

Cloruro de Magnesio:

Se utilizaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio de 2, 3, 4 y 5 mM y se determinó que la concentración óptima para la coamplificación fue de 3 mM a esta concentración se visualizan claramente las dos bandas esperadas que corresponden a los fragmentos de interés. En la figura 5 B se observa en las muestras 1 y 3 la amplificación de β -actina y *Odc* respectivamente y en las muestras 5, 7, 9 y 11 la coamplificación de *Odc*/ β -actina, las muestras 2, 4, 6, 8 y 10 corresponden a los controles negativos de la PCR.

Amortiguador:

Se estandarizaron las concentraciones óptimas del amortiguador 1X y 1.5X y se observó que la concentración de 1.5X mejora el patrón de bandeo. En la figura 5 C se observa en las muestras 1 y 2 la coamplificación de *Odc*/ β -actina a la concentración 1X, por duplicado y en las muestras 4 y 5 a 1.5X, los carriles 3, 6 y 7 corresponden a los controles negativos de la PCR.

Taq polimerasa:

Finalmente se utilizaron volúmenes de Taq polimerasa de 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 U y de acuerdo al patrón de bandedo se determinó que la óptima fue de 1.25 U por reacción de PCR de 25 μ L. En la figura 5 D se observan los resultados de la PCR, en las muestras 1, 3, 5, 7 y 9 corresponden a la coamplificación de *Odc*/ β -actina y las muestras 2, 4, 6, 8 y 10 a los controles negativos de la PCR.

Validación de la RT-PCR multiplex

Una vez optimizadas las condiciones de la PCR multiplex se procedió a validar la RT-PCR, la cual consistió en optimizar los siguientes parámetros: cantidad de RNA, concentración y proporción de cebadores, optimización de la cantidad de ciclos y reproducibilidad de la RT-PCR multiplex.

Optimización de la cantidad de RNA

Un parámetro importante para la validación de la técnica de RT-PCR multiplex fue la determinación de la cantidad óptima de RNA total (ng), ya que la cantidad de producto final de PCR depende en gran medida de la abundancia de la secuencia blanco. Mientras menor es la concentración de cDNA utilizada en la PCR mayor será el coeficiente de variación (CV) al momento de evaluar las replicas de la PCR (por cuadruplicado) (Ailenberg y Silverman, 1997).

Se realizaron PCR multiplex por cuadruplicado con cantidades decrecientes de RNA (1000 a 31.25 ng). Donde se calculó el CV expresado en porcentaje para cada reacción. La concentración de RNA total óptima fue de 1000 ng con un CV de 3.9%, lo que significa una menor variabilidad entre las muestras (Figura 6 A). Posteriormente se realizó una curva donde se representa la normalización del *Odc* con respecto a β -actina para diferentes cantidades de RNA (Figura 6 B).

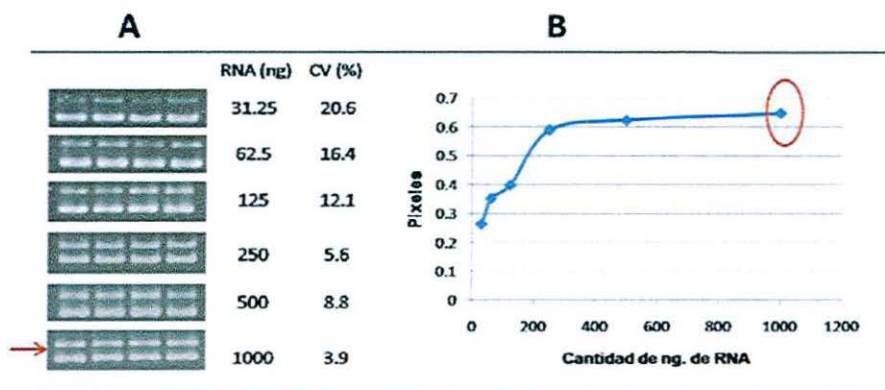


Figura 6. Optimización de RNA total A) Coamplificación de *Odc*/ β -actina con diferentes cantidades de RNA total y su respectivo CV. B) Curva de RNA.

Optimización de la concentración y proporción de Cebadores

Por otra parte la concentración de cebadores es un factor limitante de la reacción, sin embargo, la adición excesiva de cebadores podría inhibir la reacción debido a que captura $MgCl_2$ y disminuye la actividad de la *Taq* polimerasa.

Se realizaron dos experimentos de PCR multiplex por triplicado con diferentes concentraciones y proporciones de cebadores para *Odc* y β -actina con las condiciones de PCR multiplex previamente definidos. Fue necesario mantener a la *Odc* a un nivel constante de expresión y ajustar la concentración de los cebadores de la β -actina para obtener una cinética de reacción similar para ambos fragmentos (numero de pixeles en la Figura 7 A donde indica la flecha).

En el primer experimento los cebadores para la *Odc* se mantuvieron a una concentración de $0.2\mu M$ y los de la β -actina se modificaron progresivamente entre $0.2\mu M$ y $0.004\mu M$. El producto de la PCR se cuantifico por pixeles (Figura 7 A) y se realizó una curva de regresión lineal para *Odc* y β -actina (Figura 7 B). Se observa que al modificar la concentración de cebadores de la β -actina en estas condiciones se modifican también la intensidad de la banda representativa de *Odc*.

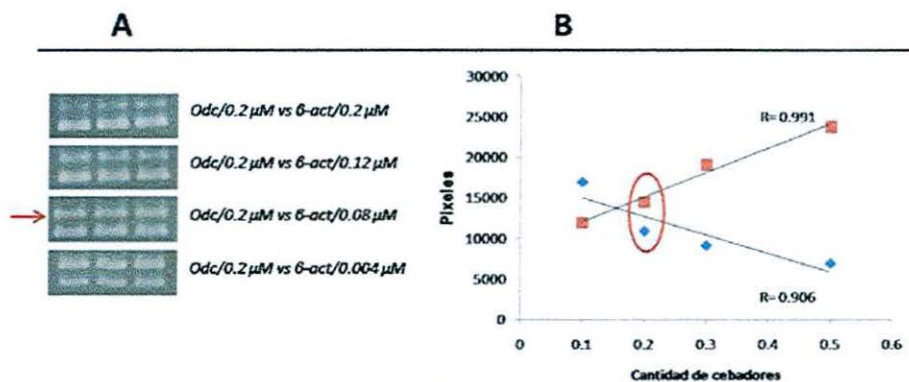


Figura 7. Optimización de cebadores *Odc/β-actina*. A) Coamplificación de *Odc/β-actina* con diferentes cantidades de cebadores. B) Regresión lineal para los cebadores de *Odc* (azul) y *β-actina* (rojo).

Por lo tanto, se realizó otra PCR multiplex por triplicado donde la *Odc* se mantuvo a una concentración constante de $0.32 \mu\text{M}$ y la *β-actina* fue diferente de $0.2 \mu\text{M}$ a $0.004 \mu\text{M}$ (Figura 8 A donde indica la flecha) y posteriormente se realizó la curva de regresión lineal, para determinar las concentraciones óptimas de ambos cebadores. Los resultados muestran que la concentración óptima para la *Odc* fue de $0.32 \mu\text{M}$ y *β-actina* de $0.08 \mu\text{M}$ (Figura 8 B) ya que se observa que la intensidad de la banda de la *Odc* es menos afectada ($R = 0.807$) cuando se modifica a la *β-actina*.

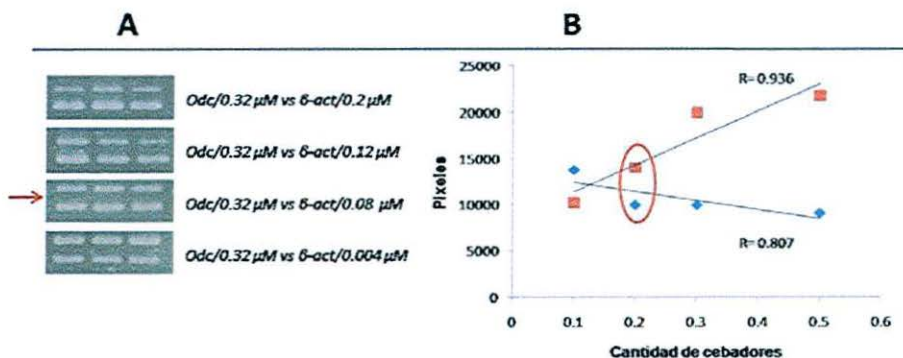


Figura 8. Optimización de cebadores *Odc/β-actina*. A) Coamplificación de *Odc/β-actina* con diferentes cantidades de cebadores. B) Regresión lineal para los cebadores de *odc* (azul) y *β-actina* (rojo).

Optimización de la cantidad de ciclos

La reacción de PCR depende además del número de ciclos que se utilice en el programa de PCR ya que existe una relación directa entre el número de ciclos y la cantidad de producto durante la fase exponencial de la reacción. Se estableció que el número óptimo de ciclos para la coamplificación fue de 35.

Se evaluaron diferentes ciclos (20 a 45) para la PCR multiplex por cuadruplicado, en el ciclo número 35 se observa una adecuada coamplificación con un CV de 5.1% (Figura 9 A donde indica la flecha). La figura 9 B representa la curva correspondiente al experimento.

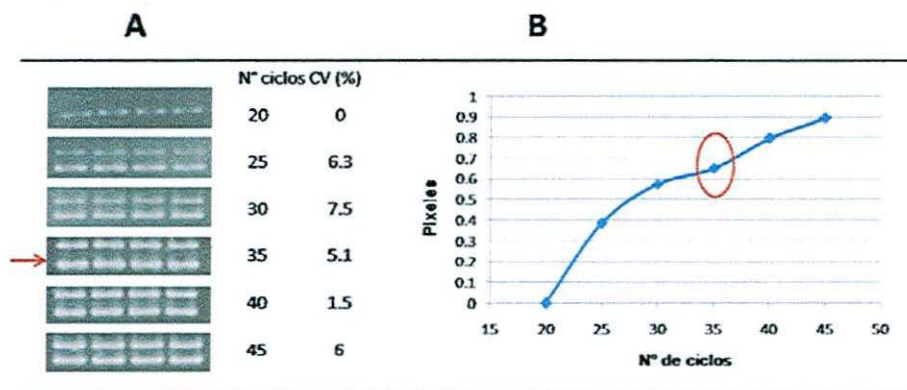


Figura 9. Optimización de ciclos *Odc/β-actina*. A) Coamplificación de *Odc/β-actina* a diferentes N° de ciclos. B) Curva de ciclos para la PCR multiplex.

Reproducibilidad de la RT-PCR multiplex

Finalmente para la validación de esta prueba se necesitó evaluar la reproducibilidad del ensayo el cual se evaluó con dos experimentos completamente independientes en las mismas condiciones experimentales con una misma muestra y se analizó la expresión de cada experimento por cuadruplicado (Figura 10 A), (Henegariu *et al.*, 1997). Se obtuvieron CV de 8.5 % y 4.6 % (Figura 10 B) menores a 10 similar a lo reportado anteriormente lo cual confirmó la validación de la RT-PCR multiplex (Ailenberg y Silverman, 1997; Willey *et al.*, 2002 y Joyce, 2002) y permitió la evaluación semicuantitativa de la transcripción del gen *Odc* en muestras de riñón y colon de ratones experimentales y control.



A		B				CV (%)
	Exp 1	0.50377	0.46232	0.50626	0.50626	8.5
	Exp 2	0.43296	0.47587	0.46642	0.43716	4.6
	Total					8.5

Figura 10. Reproducibilidad de *Odc/β-actina*. A) Experimentos independientes de la coamplificación de *Odc/β-actina*. B) Coeficiente de variación de los experimentos.

Condiciones establecidas para la RT-PCR multiplex

En el cuadro 3 y 4 se resumen los diferentes parámetros estandarizados previamente para la RT-PCR multiplex de *Odc* y *β-actina* y el programa de coamplificación.

Cuadro 3. Condiciones de reacción de las PCR de *Odc* y *β-actina*

Reactivo	Concentración	Cantidad (μL)	Concentración
	Inicial		Final
Amortiguador	10 X	3.75	1.5 X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
MgCl ₂	50 mM	1.5	3 mM
Cebador F <i>β-actina</i>	10 μM	0.2	0.08 μM
Cebador R <i>β-actina</i>	10 μM	0.2	0.08 μM
Cebador F <i>odc</i>	10 μM	0.8	0.32 μM
Cebador R <i>odc</i>	10 μM	0.8	0.32 μM
<i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/μL	0.25	1.25 U/reacción
cDNA (a partir de 1000 ng RNA total)	_____	0.5	_____
H ₂ O MilliQ	_____	16.5	_____
Vol. total (μL)	_____	25	_____

Cuadro 4. Programa de la amplificación de *Odc* y β -*actina*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización previa	95	2 min	} 35 ciclos
Desnaturalización	95	45 s	
Alineación	66	1 min	
Elongación	72	45 s	
Extensión final	72	10 min	

Comparación de la variabilidad de la expresión de la *Odc* en riñón y colon

En un estudio previo se comparó la dispersión de los datos de la expresión de la *Odc* en colon (n=5) y riñón (n=7) de ratones tratados con DMH, donde se indica mediante la prueba f de Fisher que no hay diferencias significativas entre colon y riñón con un nivel de significancia del 95% (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de varianzas en riñón y colon de ratones tratados con DMH

Prueba F para grupo DMH	Colon	Riñón
Media	0.44388	0.73812857
Varianza	0.045329147	0.01053646
Observaciones	5	7
Grados de libertad	4	6
F	4.302124759	
Valor crítico para F	4.53367695	

Distribución f de fisher para grupo DMH, $p < 0.05$

En cambio al comparar la dispersión de los datos de la expresión de la *Odc* en riñón (n=4) y colon (n=4) de ratones control. Se encontró que la varianza en colon (0.032) existen diferencias significativas en comparación con riñón (0.003) ($p < 0.05$) lo que indica que la expresión del fragmento *Odc* tiene menor varianza en riñón que en colon (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de varianzas en riñón y colon de ratones control		
Prueba F para grupo control	Colon	Riñón
Media	0.4634750	0.673175
Varianza	0.03285387	0.0031827
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	10.32265441	
Valor crítico para F	9.276628154	

Distribución f de fisher para grupo control, con una $p < 0.05$

Análisis de la transcripción de la *Odc* por RT-PCR semicuantitativa

Para el análisis de la transcripción de la *Odc* se trabajó con tejido de riñón en el grupo DMH (n=5) y grupo control (n=4). En la figura 11 se observa el resultado de una PCR representativa donde la intensidad de la banda de 659 pb que corresponde al fragmento de la *Odc* es más alta en ratones tratados con DMH en comparación con ratones control (Figura 11).

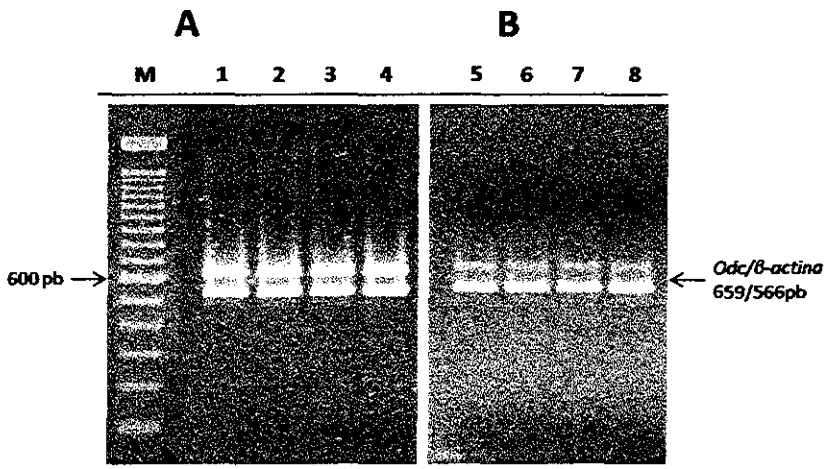


Figura 11. Coamplificación de *Odc*/ β -actina. A) Gel de agarosa a una concentración de 1.5%, marcador de 100 pb, carriles 1, 2, 3 y 4 *Odc*/ β -actina de muestra DMH. B) carriles 5, 6, 7 y 8 *Odc*/ β -actina de muestra control.

Se observó un incremento notable de la transcripción de la *Odc* en las muestras del grupo DMH (media de 0.60494 ± 0.1776161) en comparación con el grupo control (media de 0.346375 ± 0.827532) (Figura 12).

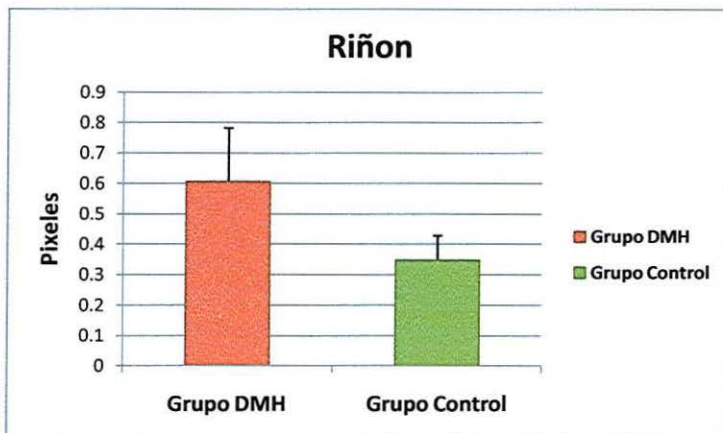


Figura 12. Representación de la media de grupo DMH y control. Los resultados representan la media \pm desviación estándar, donde se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con una $p < 0.05$.

Se realizó la prueba de *f* de Fisher, para determinar si las varianzas entre los grupos experimentales fueron iguales o diferentes, los resultados de la misma muestras que las varianzas fueron iguales para ambos grupos. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de varianza entre grupos.

Prueba F para dos grupos	DMH	Control
Media	0.60494	0.346375
Varianza	0.03154759	0.00684818
Observaciones	5	4
Grados de libertad	4	3
F	4.60671481	
Valor crítico para F	9.11718225	

Distribución *f* de fisher para dos grupos, con una $p < 0.05$

Posteriormente se aplicó la prueba de t de Student para comparar las medias de la expresión de la *Odc* entre grupos y se encontró que existen diferencias significativas entre las medias de los grupos tratados con DMH y grupo control (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de la expresión de *Odc* entre ratones tratados con DMH y control

Prueba t para dos grupos	DMH	Control
Media	0.60494	0.346375
Varianza	0.031547593	0.006848176
Observaciones	5	4
Grados de libertad	7	
Estadístico t	2.662231336	
Valor crítico de t	2.364624251	

Prueba t Student para dos grupos, con una $p < 0.05$

Evaluación de la expresión de la ODC por Western Blot

Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Se obtuvo la curva estándar con BSA ($R= 0.997$) (Figura 13). Se cuantificó la concentración de proteínas de las muestras de interés en relación a la curva estándar. La concentración proteica de las muestras de riñón fue de 985 a 515 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una media de 757.5 y las muestras de colón fueron de 715 a 465 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una media de 580.62.

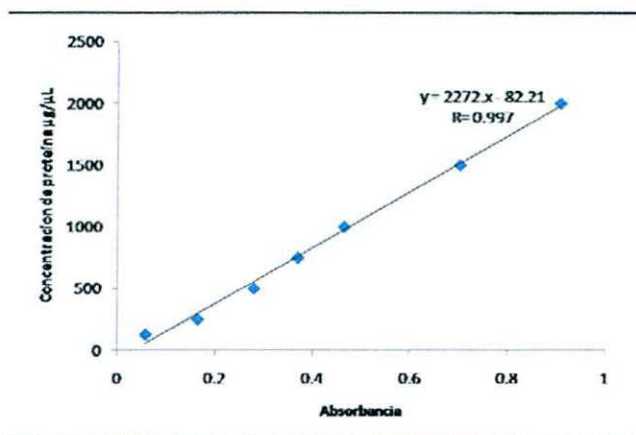


Figura 13. Curva estándar de BSA. Cuantificación de proteínas por micrométodo de Bradford.

La cantidad óptima de proteínas totales para detectar la β -actina y ODC fue de 50 a 75 μg , carriles 2 y 3 de la figura 14 donde se muestra el experimento para la β -actina (43 Kda). La intensidad de la señal quimioluminiscente fue débil con 25 μg de proteína total y fuerte cuando se aplicaron 100 μg de proteína, carriles 1 y 4 respectivamente de la figura 15.

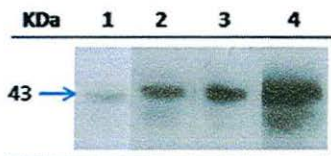


Figura 14. Revelado por quimiolumiscencia de diferentes concentraciones de β -actina. Carriles, (1) 25 μg ; (2) 50 μg ; (3) 75 μg ; (4) 100 μg .

Electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE) y electrotransferencia

Una vez establecida la concentración de proteína, se cargaron 50 µg de muestra. En figuras 15 A y 16 A se observa la separación de proteínas en geles de acrilamida de los extractos de riñón y colon para los grupos DMH y control. En las figuras 15 B y 16 B se muestra la electrotransferencia de los geles de acrilamida a las membranas PVDF teñidas con rojo de Ponceau.

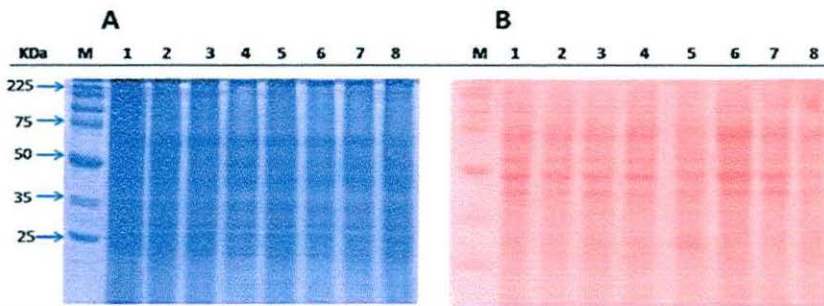


Figura 15. Electroforesis y transferencia de riñón. A) Se observa el patrón electroforético de extractos de riñón el primer carril contiene el marcador, el carril 1, 2, 3, 4 muestras de grupo DMH y 5, 6, 7, 8 muestras de grupo control. B) Se observa el patrón de corrimiento electroforético transferido a la membrana de PVDF el primer carril contiene el marcador, el carril 1, 2, 3, 4 muestras de grupo DMH y 5, 6, 7, 8 muestras de grupo control.

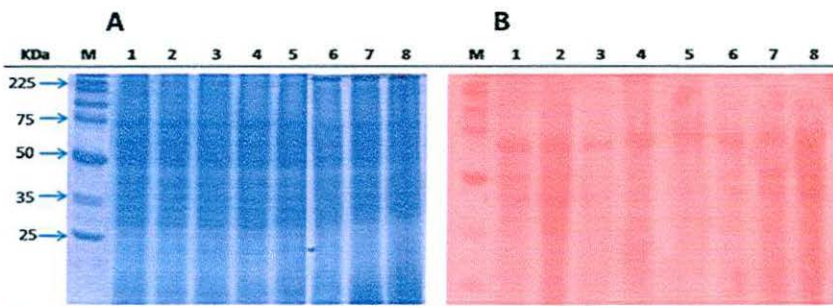


Figura 16. Electroforesis y transferencia de colon. A) Se observa el patrón electroforético de extractos de colon el primer carril contiene el marcador, el carril 1, 2, 3, 4 muestras de grupo DMH y 5, 6, 7, 8 muestras de grupo control. B) Se observa el patrón de corrimiento electroforético transferido a la membrana de PVDF el primer carril contiene el marcador, el carril 1, 2, 3, 4 muestras de grupo DMH y 5, 6, 7, 8 muestras de grupo control.

Identificación de proteínas por Western Blot

Una vez realizada la electrotransferencia, la detección se realizó con los anticuerpos primarios y secundarios como se describe en materiales y métodos. Las señales detectadas para el anticuerpo de la ODC fueron más intensas en el grupo DMH en comparación con el grupo control en riñón (Figura 17), lo que representa una mayor expresión de la proteína en ratones con DMH. Las muestras de riñón de ambos grupos fueron expuestas al anticuerpo de la β -actina como control para el experimento (Figura 18).

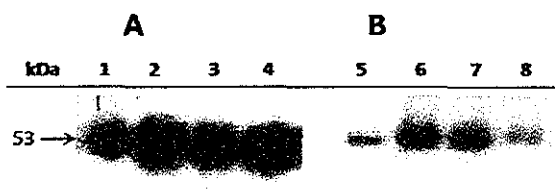


Figura 17. Revelado por quimioluminiscencia de riñón con ODC. A) Muestras de riñón del grupo DMH, carriles 1, 2, 3, 4. B) Muestras de riñón de grupo control 5, 6, 7, 8.

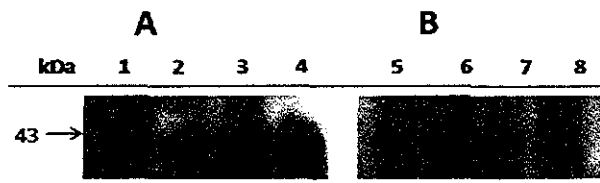


Figura 18. Revelado por quimioluminiscencia de riñón con β -actina. A) Muestras de riñón del grupo DMH, carriles 1, 2, 3, 4. B) Muestras de riñón de grupo control 5, 6, 7, 8.

El análisis de detección de ODC por western blot en muestras de colon no mostró diferencia entre grupo DMH y el grupo control (Figura 19) para el anticuerpo de la ODC. Las muestras de colon de ambos grupos fueron expuestas al anticuerpo de la β -actina como control para el experimento (Figura 20).

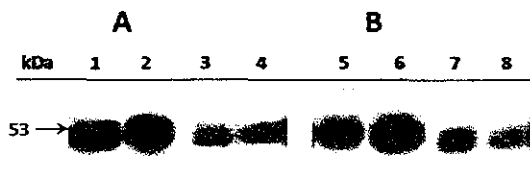


Figura 19. Revelado por quimiolumiscencia de colon con ODC. A) Muestras de colon del grupo DMH, carriles 1, 2, 3, 4. B) Muestras de colon de grupo control 5, 6, 7, 8.

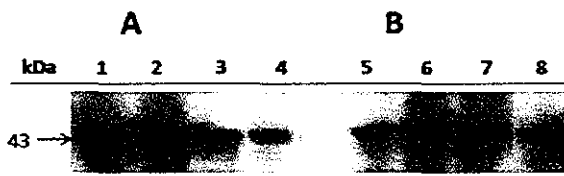


Figura 20. Revelado por quimiolumiscencia de colon β -actina. A) Muestras de colon del grupo DMH, carriles 1, 2, 3, 4. B) Muestras de colon de grupo control 5, 6, 7, 8.

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un serio problema de salud pública para el cual los tratamientos disponibles son agresivos, no son selectivos ni eficaces al 100%. Para el estudio de este padecimiento se requiere de modelos experimentales y moléculas marcadoras de su desarrollo. La ornitina descarboxilasa (ODC) es la principal enzima limitante en la biosíntesis de las PAs y se induce en respuesta a estímulos de crecimiento, como hormonas, factores de crecimiento y promotores de tumores. La regulación de la ODC puede ocurrir en varios niveles, la transcripción del gen (Evan *et al.*, 1992; Iyengar *et al.*, 2001), la traducción del RNAm (Wallon *et al.*, 1995; Kahana y Nathans, 1985; Shant y Pegg, 1999) y las interacciones y modificaciones post-traduccionales de la enzima (Heller *et al.*, 1976; Flamigni *et al.*, 1994). Diversos estudios se centran en la regulación de la ODC y el metabolismo de las PAs para posibles blancos terapéuticos. Se ha encontrado que los inhibidores de la ODC suprimen la formación de tumores en modelos experimentales de carcinogénesis de vejiga, mama, colon y piel (Loprinzi *et al.*, 1996; Carbone *et al.*, 1998 y Love *et al.*, 1993).

En el presente trabajo se estudió la expresión de la ODC a nivel transcripcional y traduccional en ratones Balb/c tratados con DMH. Para evaluar la transcripción del fragmento del gen *Odc* se implementó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Una de las aportaciones de este trabajo consistió en la estandarización de las condiciones de la PCR múltiplex para *Odc* y β -*actina* (gen control). Se inició con la optimización de la temperatura de alineación de los dos pares de cebadores ya que es un factor determinante para una reacción de coamplificación por PCR (Henegariu *et al.*, 1997). Ambos pares de cebadores deben de presentar una cinética similar en la reacción de PCR y unirse de manera selectiva y específica a sus sitios complementarios respectivos (entre más aumente la temperatura de alineación, más selectiva es la unión a la secuencia blanco). La concentración de cloruro de magnesio y la concentración del amortiguador son dos factores importantes para la optimización de la reacción, el primero es el cofactor de la *Taq* polimerasa y contribuye a una mejor actividad de la enzima y el segundo genera un ambiente adecuado para la reacción, (Favre y Rudin, 1996). Finalmente, se determinó la concentración de la *Taq* polimerasa ya que es la molécula que lleva a cabo el proceso de amplificación (Henegariu *et al.*, 1997).

Para la validación de esta prueba se verificó la reproducibilidad de la RT-PCR semicuantitativa en muestras biológicas, con dos experimentos independientes y se

analizó el producto de la RT-PCR por cuadruplicado. Se obtuvieron CV menores a 10 lo cual confirmó la validación de la RT-PCR multiplex de acuerdo a lo reportado por (Ailenberg y Silverman 1997; Willey *et al.*, 2002 y Joyce, 2002) y permitió proceder a la evaluación semicuantitativa de la transcripción de la *Odc* en muestras de riñón y colon de los grupos experimentales.

Con la finalidad de definir el tejido más apropiado para el presente estudio, se comparó la varianza en la expresión de la *Odc* en riñón y colon de ratones tratados con DMH y ratones control. Los resultados muestran una mayor dispersión en el colon de ambos grupos. Por lo tanto, se decidió estudiar la transcripción de la *Odc* solamente en riñón. Nuestro modelo murino muestra las primeras evidencias de CCR después de 7 semanas de inducción (Cázares, 2010); Newberne y Rogers en 1973, encontraron que el 100% de los ratones tratados con DMH desarrollaron CCR entre la semana 22 y 30. Por lo tanto los ratones empleados en este estudio se sacrificaron a la semana 31; en todos los ratones del grupo experimental se observaron anomalías en el colon.

Los resultados de este trabajo muestran que el nivel de transcritos de *Odc* en riñón de ratones Balb/c tratados con DMH por 24 semanas y sacrificados a la semana 31, fue significativamente más elevado en comparación con el grupo control. Nuestros resultados coinciden con Hu *et al.*, en el 2005, quienes encontraron que la expresión de la *Odc* se asocia con la etapa de malignidad. Sus hallazgos sugieren que el aumento del RNAm de la ODC tiene un papel importante en el proceso de progresión del tumor colorrectal. De manera similar Kaminski *et al.*, en el 2010, en un estudio *in vitro* (línea celular de cáncer de colon CaCo-2) encontraron un incremento de la *Odc* de 3 a 4 veces en comparación con el grupo control. Sin embargo, existen factores postranscripcionales que regulan la expresión de la ODC; por lo que se analizó la expresión de la ODC a nivel proteína por Western blot para comparar y confirmar los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativa.

Después de analizar los resultados por RT-PCR semicuantitativa se estandarizó la técnica de Western blot la cual consistió en definir las condiciones de extracción, cuantificación, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), electrotransferencia y detección de las proteínas de interés de muestras de riñón y colon de ratones tratados con DMH y del grupo control. Se determinó que 50 µg de proteínas totales separadas por PAGE permitieron detectar la ODC, esta cantidad se encuentra dentro del rango (25 a 100 µg) empleado por otros autores (Kaminski *et al.*, 2010; Levillain *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2007 y Yuan *et al.*, 2001). Los resultados confirmaron el tamaño reportado para la ODC

(53 Kda) y la β -actina (43 Kda) (Hayashi, 1989; Janne *et al.*, 1991; Paschen, 1992 y O'Brien *et al.*, 1992).

Uno de los factores que determinó el éxito de la técnica de Western blot fue el factor de dilución de los anticuerpos. Una dilución de 1:200 del anticuerpo primario y de 1:50,000 del anticuerpo secundario fueron óptimas para detectar la ODC, mientras que una dilución de 1:8,000 del anticuerpo primario y de 1:10,000 del secundario permitieron una apropiada detección de la β -actina. Estas diluciones se encuentran dentro del rango reportado en otros trabajos (Kaminski *et al.*, 2010; Ning *et al.*, 2007)

La evaluación de la expresión de la ODC a nivel traduccional mostró que fue más elevada en riñón de ratones tratados con DMH que en el grupo control. Mientras que el análisis de las muestras de colon no mostró resultados que permitieran llegar a la misma conclusión. Estos resultados confirman lo observado con RT-PCR semicuantitativa y sugieren que para el estudio de la expresión de la ODC, el riñón es un órgano más adecuado que el colon.

Nuestro estudio no mostró diferencias en la cantidad de ODC entre colon del grupo experimental y el del grupo control. Sin embargo, varios autores han reportado diferencias en la expresión de la ODC en mucosa de colon de pacientes con CCR. Por ejemplo, Hu *et al.*, en el 2005, reportaron una alta expresión de la ODC en muestras de pacientes con CCR, también Hixson *et al.*, en 1993 trabajó con muestras de pacientes con CCR y reporta un aumento de la ODC en neoplasia de mucosa de colon ascendente, descendente, sigmoideo y recto en comparación con mucosa normal. Debido al tamaño del colon del ratón y a la cantidad de tejido disponible, nuestro estudio se llevo a cabo en colon total, lo que podría haber afectado los resultados. La variabilidad observada en la expresión de la ODC en colon del grupo experimental y del grupo control sugiere la necesidad de trabajar con mucosa colónica.

A pesar de que la DMH es un carcinógeno específico de colon (Newberne y Rogers, 1973), nuestros resultados confirman que la ODC en riñón es un buen marcador tumoral. Cabe mencionar que desde los años 80s, se conoce que el riñón presenta mayor expresión de la ODC que muchos otros órganos y desde entonces es ampliamente utilizado para estudiar la ODC en modelos murinos (Janne *et al.*, 1984; Kontula *et al.*, 1984; Berger *et al.*, 1984; Brabant *et al.*, 1988).

CONCLUSIONES

- 1) La técnica de RT-PCR semicuantitativa es útil para detectar diferencias en la expresión de la *Odc* a nivel transcripcional entre ratones control y ratones con CCR inducido por DMH.
- 2) El análisis de la expresión de la ODC a nivel traduccional con la técnica de Western blot mostró el mismo patrón en los diferentes grupos de estudio. Por lo que ambas técnicas son adecuadas para estudiar la expresión de la ODC.
- 3) En RT-PCR semicuantitativa y Western blot el riñón mostró una menor dispersión de los datos en relación al colon por lo que se considera que el riñón es un tejido más adecuado para detectar diferencias en los niveles de la ODC entre ratones control y ratones tratados con DMH.
- 4) Los resultados de este trabajo muestran un aumento en la expresión de la *Odc* a nivel transcripcional y traduccional en riñón de ratones tratados con DMH en comparación con los controles.
- 5) El presente estudio permite sugerir que la ODC juega un papel importante en la patología del CCR, por lo que se propone a la ODC como una molécula biomarcadora de CCR en modelos murinos.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la ODC durante el desarrollo de CCR inducido con DMH.
- Estudiar la ODC en mucosa de colon de ratón para disminuir la variabilidad de la expresión de esta enzima en este tejido.
- El análisis de la ODC permitirá evaluar diversos factores involucrados en el desarrollo del CCR.

GLOSARIO

Adenoma: Tumor de estructura semejante a la de las glándulas.

Alelo: Cada uno de los genes de un par, que ocupan el mismo lugar en dos cromosomas homólogos. Ejercen una misma función sobre un carácter o rasgo de organización, color o forma, con efectos diversos.

Biogénesis: Teoría biológica según la cual todo ser vivo procede de otro ser vivo.

Biomolécula: Molécula constituyente de los seres vivos; está compuestas mayoritariamente de carbono, hidrógeno, oxígeno o nitrógeno

Carcinoma: Cáncer formado a expensas del tejido epitelial de los órganos, con tendencia a difundirse y producir metástasis.

Carcinoma *in situ*: Grupo de células anormales que permanecen en el mismo lugar en el que se formaron.

Caucásica: Es un término usado para designar a personas cuya tonalidad de piel clara suele ser asociada a poblaciones de origen europeo.

Cepa: Una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Cofactor: Es un componente no proteico, termoestable y de bajo peso molecular, necesario para la acción de una enzima.

Colon sigmoide: Parte del intestino grueso que, en el hombre, continúa después del colon descendente, a la altura de la pelvis y es seguido por el recto.

Dímero: Especie química que consiste en dos subunidades estructuralmente similares denominadas monómeros unidas por enlaces que pueden ser fuertes o débiles.

Fenotipo: Conjunto de caracteres que manifiestan los individuos de una especie en un ambiente determinado.

Gen: Cada una de las unidades dispuestas en un orden fijo a lo largo de los cromosomas y que determinan la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos.

Heterodímero: Molécula formada por dos componentes diferentes, pero estrechamente relacionados, como una proteína compuesta por la unión de dos cadenas separadas

Homoímero: Proteína compuesta por dos cadenas peptídicas idénticas

Inmunocentellografía: Procedimiento de imaginología en el que se administran a la persona anticuerpos marcados con sustancias radiactivas. Se toma una imagen de los sitios del cuerpo donde se localiza el anticuerpo.

Intraepitelial: Interior de una capa de las células que forman la superficie o recubrimiento de un órgano.

Linfoma: Tumor del tejido linfático o linfoide

Metástasis: Propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició; ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática

Monómero: Compuesto de bajo peso molecular cuyas moléculas son capaces de reaccionar entre sí o con otras para dar lugar a un polímero

Neoplasia: Tumor producido por la multiplicación incontrolada de células. Según el grado de diferenciación de sus células y la capacidad invasiva y metastásica se dividen en benignas y malignas.

Nódulo: Pequeño tumor nudoso.

Nucleótido: Molécula orgánica formada por una base nitrogenada, una pentosa y ácido fosfórico, que constituye la unidad estructural de los ácidos nucleicos. Según que la pentosa sea la ribosa o la desoxirribosa, el nucleótido resultante se denomina ribonucleótido o desoxirribonucleótido

Oncogén: Gen celular desencadenante de un tumor canceroso.

Peritoneo: Membrana serosa que reviste la cavidad abdominal de los vertebrados y forma pliegues que envuelven las viseras situadas en esta cavidad.

Polimorfismo: Propiedad de los ácidos nucleicos y las proteínas que pueden presentarse bajo varias formas moleculares. Es un fenómeno importante en la genética y en la patología molecular.

Pólipo: Crecimiento que sobresale de una membrana mucosa.

Positrón: Partícula elemental de antimateria de masa igual a la del electrón, pero de carga positiva

Proteosoma: El proteosoma es un complejo macromolecular cuya función es la degradación de proteínas.

Tamizaje: Examinar o seleccionar concienzudamente.

Tomografía: Técnica de registro gráfico de imágenes corporales, correspondiente a un plano o corte predeterminado.

BIBLIOGRAFÍA:

- Ailenberg M. and Silverman M. (1997). "Semiquantitative RTPCR: Enhancement of Assay Accuracy and Reproducibility." *BioTechniques*. 22(4):630-636.
- Akhaven-Tafti H., Koutek B., Prestwich G., Howlett A., Chin S., Salehani D., Akhavan N. and Deutsch D. (1994). "Inhibitors of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis." *The Journal of Biological Chemistry*. 269(37):22937-40.
- Almud J. J., Oliveira M.A., Kern A. D., Grishin N. V., Phillips M. A. and Hackert M. L. (2000) "Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding." *Journal of Molecular Biology*. 295: 7-16.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-10.
- American Cancer Society. (2008). *Cancer Facts and Figures 2008*. Atlanta, GA: American Cancer Society. Documento revisado enero 2011.
<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>
- American Cancer Society. (2010). *Cancer Facts and Figures 2010*. Atlanta, GA: American Cancer Society. Documento revisado enero 2011.
<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>
- American Society of Clinical Oncology (1996). "Clinical Practice Guidelines for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer." *Journal of Clinical Oncology*. 14(10):2843-77.
- Berger F. G., Szymanski P., Read E. and Watson G. (1984). "Androgen-regulated ornithine decarboxylase mRNAs of mouse kidney." *The Journal of Biological Chemistry*. 259 (12):7941-7946.
- Bolt M. W. and Mahoney P. A. (1997). "High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 247: 185-192.
- Brabant M., McConlogue L., van Daalen Wetters T. and Coffino P. (1988). "Mouse ornithine decarboxylase gene: Cloning, structure, and expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85: 2200-2204.
- Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochemistry*. 72:248-254.

-
- Carbone P. P., Douglas J. A., Larson P. O., Verma A. K., Blair I. A., Pomplun M. and Tutsch K. D. (1998). "Phase I chemoprevention study of piroxicam and alpha-difluoromethylornithine." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 7: 907-912.
- Cazares A. A. (2010). "Estandarización de un modelo experimental de cáncer de colon en ratones Balb/c 1,2-dimetildracina." Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Chao A, Thun M.J., Jacobs E. J., Henley S. J., Rodriguez C. and Calle E. E. (2000). "Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the Cancer Prevention Study II." *Journal of the National Cancer Institute*. 92(23):1888–1896.
- Coffino P. (2001). "Regulation of cellular polyamines by antizyme." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2:188-194.
- Coleman C. S., Stanley B. A., Viswanath R. and Pegg A. E. (1994). "Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase." *The Journal of Biological Chemistry*. 269(5):3155-8.
- Davis R. H., Morris D. R. and Coffino P. (1992). "Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase." *Microbiological*. 56(2): 280-290.
- Di Gregorio C., Losi L., Fante R., Modica S., Ghidoni M., Pedrodi M., Tamassia M. G., Gafa L., Ponz de Leon and Roncucci L. (1997). "Histology of aberrant cript foci in the human colon." *Histopatology* . 30:328-334.
- Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S., Littlewood T. D., Land H., Brooks M., Waters C. M., Penn L. Z. and Hancock D. C. (1992). "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." *Cell*. 69: 119-128.
- Favre N. and Rudin W. (1996). "Salt-Dependent Performance Variation of DNA Polymerases in Co-Amplification PCR." *BioTechniques*. 21:28-30.
- Flamigni F., Campana G., Carboni L., Rossoni C. and Spampinato S. (1994). "Post-transcriptional inhibition of ornithine decarboxylase induction by zinc in a difluoromethylornithine resistant cell line." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1201: 101-105.
- Fuchs C. S., Giovannucci E. L., Colditz G. A., Hunter D. J., Speizer F. E., and Willett W C. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." *The New England Journal of Medicine*. 331(25):1669-1674.
- Granados G. M. and Herrera G. (2010). "Manual de Oncología." 4ª edición Mc Graw Hill Interamericana Editores p. 595-598 México D. F.
-

-
- Gray N. K. and Hentze M. W.. (1994). "Regulation of protein synthesis by mRNA structure." *Molecular Biology Reports*. 19: 195-200.
- Hames B. D. and Rickwood D. (1998). "Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach." 3rd Edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press.
- Harlow E. D. and Lane D. (1999). "Using Antibodies." Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hayashi S. (1989). "Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology and Molecular Genetics." Pergamon Press, New York.
- Hayashi, S. and Murakami, Y. (1995). "Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase." *Biochemistry. Journal*. 306:1-10.
- Heiler J. S., Fong W. F. and Canellakis E. S. (1976). "Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 73: 1858-1862.
- Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H. and Vogt P.H. (1997). "Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol." *BioTechniques*. 23(3):504-511.
- Hill L. B., O'Connell J. B. and Ko C.Y. (2006). "Colorectal cancer: Epidemiology and health services research." *Surgical Oncology Clinics of North America* 15(1):21-37.
- Hixson L. J., Garewal H. S., McGee D. L., Sloan D., Fennerty M. B., Sampliner R. E. and Gerner E. W. (1993). "Ornithine decarboxylase and polyamines in colorectal neoplasia and mucosa." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2(4):369-74
- Howard R. A., Freedman D. M., Park Y., Hollenbeck A., Schatzkin A. and Leitzmann M. F. (2008). "Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study." *Cancer Causes and Control*. 19(9):939-953.
- Hu H. Y., Liu X. X., Jiang C. Y., Lu Y., Liu S. L., Bian J. F., Wang X. M., Geng Z., Zhang Y. and Zhang B. (2005). "Ornithine decarboxylase gene is overexpressed in colorectal carcinoma." *World Journal of Gastroenterology*. 15:2244-8.
- INEGI. (2009). Documento revisado enero 2011.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../estadisticas/.../cancer14.doc>.
- Instituto Nacional de Cáncer (2010). Documento revisado enero 2011.
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos>
-

-
- Isacson U., and Watermark G. (1974). "The effect of beta blockade and-or physical training in patients with angina pectoris." Current therapeutic research. 16(3):171-83.
- Ivanov I. P., Gesteland R. F. and Atkins J. F. (2000). "Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, wich is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit." Nucleic Acids Research. 28 (17): 3185-3196.
- Iyengar R. V., Pawlik C. A., Krull E. J., Phelps D. A., Burger R. A., Harris L. C., Potter P. M. and Danks M.K. (2001). "Use of a modified ornithine decarboxylase promoter to achieve efficient c-MYC- or N-MYC-regulated protein expression." Cancer Research. 61: 3045-3052.
- Jackson L. K., Baldwin J., Akella R., Goldsmith E. J. and Phillips M. A. (2004). "Multiple active site conformations revealed by distant site mutation in ornithine decarboxylase." Biochemistry. 43 (41):12990-12999.
- Jänne O. A., Kontula K. K., Isomaa V. V. and Bardin W. (1984). "Ornithine decarboxylase mRNA in mouse kidney: a low abundancy gene product regulated by androgens with rapid kinetics." Annals New York Academy of Sciences. 438:72-84.
- Jemal A., Siegel R., Ward., Hao Y., Xu J. and Thun J. (2009). "Cancer statistics, 2009." A Cancer Journal for Clinicians 59: 225-249.
- Joyce C. (2002). "Quantitative RT-PCR." Methods in Molecular Biology, vol. 193: RT-PCR Protocols Edited by: J. O'Connell © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Kahana C. and Nathans D. (1985). "Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines." Journal of Biological Chemistry. 260: 15390-15393.
- Kaminski B. M., Loitsch S. M., Ochs M. J., Reuter K. C., Steinhilber D., Stein J. and Ulrich S. (2010). "Isothiocyanate sulforaphane inhibits protooncogenic ornithine decarboxylase activity in colorectal cancer cells via induction of the TGF- β /Smad signaling pathway." Molecular Nutrition & Food Research. 54, 1486–1496.
- Katz A. and Kahana C. (1988). "Isolation and charaterizacion of the mouse ornithine decarboxylase gene." The Journal or Biological Chemistry. 263(16):7604-7609.
- Kilpeläinen P. (2002). "Ornithine Decarboxylase expression and regulation in rat brain and in transgenic mice." Departament of Biochemistry, University Oulu, P.O. Box 3000, FIN-90014.
- Kontula K. K., Torkkeli T. K., Bardin C. W. and Jänne O. A. (1984). "Androgen induction of ornithine decarboxylase mRNA in mouse kidney as studied by complementary DNA." Biochemistry Journal. 81:731-735.
-

-
- Koushik A., Hunter D. J., Spiegelman D., Beeson W. L., van den Brandt P. A., Buring J. E., Calle E. E., Cho E., Fraser G. E., Freudenheim J. L., Fuchs C. S., Giovannucci E. L., Goldbohm R. A., Harnack L., Jacobs D. R. Jr., Kato I., Krogh V., Larsson S. C., Leitzman M. F., Marshall J. R., McCullough M. L., Miller A. B., Pietinen P., Rohan T. E., Schatzkin A., Sieri S., Virtanen M. J., Wolk A., Zeleniuch-Jacquotte A., Zhang S. M. and Smith-Warner S. A. (2007). "Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies." *Journal of the National Cancer Institute*. 99(19):1471-1483.
- Kozak M. (1989). "The scanning model for translation: an update." *The Journal of Cell Biology* 108: 229-241.
- Kucharzewska P., Welch J. E., Svensson K. J. and Belting M. (2010). "Ornithine decarboxylase and extracellular polyamines regulate microvascular sprouting and actin cytoskeleton dynamics in endothelial cells." *Experimental cell research*. 316: 2683-2691.
- Lechner P., Lind P. and Goldenberg D. M. (2000). "Can postoperative surveillance with serial CEA immunoscintigraphy detect resectable rectal cancer recurrence and potentially improve tumor-free survival?" *Serial CEA Immunoscintigraphy*. 191(5): 511-518.
- Levillain O., Greco A., Diaz J. J., Augier R., Didier A., Kindbeiter K., Catez F. and Cayre M. (2003). "Influence of testosterone on regulation of ODC, antizyme, and N1-SSAT gene expression in mouse kidney." *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 285(3):F498-506.
- Levillain O., Diaz J. J., Blanchard O. and Déchaud H. (2005). "Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine in the murine kidney." *Endocrinology*. 146(2): 950-959.
- Lonneux M., Reffad A., Detry R., Kartheuser A., Gigot J. and Pauwels S. (2002). "FDG-PET improves the staging and selection of patients with recurrent colorectal cancer." *European Journal of Nuclear Medicine*. 29(7): 915-921.
- Loprinzi C. L., Messing E. M., O'Fallon J. R., Poon M. A., Love R. R., Quella S. K., Trump D. L., Morton R. F. and Novotny P. (1996). "Toxicity evaluation of difluoromethylornithine: doses for chemoprevention trials." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 5:371-374.
- Loser C., Ulrich M., Folsch M., Paprotny C. and Werner C. (1990). "Polyamines in colorectal cancer." *Department of Medicine, Division of Gastroenterology and Endocrinology*. 65(4): 958-66.
-

-
- Love R. R., Carbone P. P., Verma A. K., Gilmore D., Carey P., Tutsch K. D., Pomplun M. and Wilding G. (1993). "Randomized phase I chemoprevention dose-seeking study of alpha-difluoromethylornithine." Journal of the National Cancer Institute. 85: 732-737.
- Lövkvist Wallström E., Takao K., Wendt A., Vargiu C., Yin H. and Persson L. (2001). "Importance of the 3'untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA in the translational regulation of the enzyme." Biochemistry Journal. 356: 627-634.
- Mangold U. (2005). "The antizyme family: polyamines and beyond." IUBMB life 57(10): 671-676.
- Martínez M. E., O'Brien T. G., Fultz K. E., Babbar N., Yerushalmi H., Qu N., Guo Y., Boorman D., Einspahr J., Alberts D. S. and Gerner E. W.. (2003). "Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene." PNAS. 100 (13): 7859-7864.
- Marton L. J. and Pegg A. E. (1995). "Polyamines as targets for therapeutic intervention." Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 35: 55-91.
- Matthews H. R. (1993). "Polyamines, chromatin structure and transcription." BioEssays. 15(8): 561-566.
- McCann P. P. and Pegg A. E. (1992). "Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy." Pharmacology Therapeutics. 54: 195-215.
- Morgan D. M. (1999). "Polyamines an overview." Molecular Biotechnology 11: 229-250.
- Newberne P. M., and Rogers A. E. (1973). "Animal model: DMH induced adenocarcinoma of the colon in the rat." American Journal of Pathology. 72:541-544.
- Nilsson J., Koskiniemi S., Persson K., Grahn B. and Holm I. (1997). "Polyamines regulate both transcription and translation of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme." European Journal Biochemistry. 250: 223-231.
- Nilsson J. A., Maclean K. H., Keller U. B., Pendeville H, Baudino T. A., and Cleveland J. L. (2004). "Mnt Loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation." Molecular and Cellular Biology. 24 (4): 1560-1569.
- Ning Q., Li C., Wei K., He J., Xu C. and Shao Q. (2007). "Regulatory effects of corticosterone on ornithine decarboxylase activity during liver regeneration in rats." Journal of Gastroenterology and Hepatology. 11:1978-82.
- Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M., Overvad K., Olsen A. Tjønneland A., Clavel F., Bourtron-Ruault M. C., Kesse E., Boeing H., Bergmann M.

-
- M., Nieters A., Linseisen J., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Tountas Y., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita H. B., Peeters P. H., Engeset D., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., González C., Navarro C., Quirós J. R., Sanchez M. J., Berglund G., Mattisson I., Hallmans G., Palmqvist R., Day N. E., Khaw K. T., Key T. J., San Joaquin M., Hérmón B., Saracci R., Kaaks R. and Riboli E. (2005) "Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition". Journal of the National Cancer Institute. 97(12):906–916.
- O'Brien M. J., O'Keane J. C., Zauber A., Gottlieb L. S. and Winawer S. J. (1992). "Precursors of colorectal carcinoma, Biopsy and biologic markers." Cancer. 70:1317-27.
- O'Brien T. G., Guo Y., Visvanathan K., Sciulli J., McLaine M., Helzlsouer K. J. and Watkins-Bruner. (2004). "Differences in ornithine decarboxylase and androgen receptor allele frequencies among ethnic groups." Molecular Carcinogenesis. 41: 120-123.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Documento revisado enero 2011.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Salud de la mujer. Nota descriptiva No.334, Noviembre de 2009. Documento revisado enero 2011.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/es/index.html>
- Packham G. and Cleveland J. L. (1997). "Induction of ornithine decarboxylase by IL-3 is mediated by sequential c-Myc-independent and c-Myc-dependent pathways." Oncogene.15: 1219-1232.
- Paschen W. (1992). "Polyamine metabolism in different pathological states of the brain." Molecular Chemistry Neuropathology. 16(3):241-71.
- Paskett E. D., Reeves K. W., Rohan T. E., Allison M. A., Williams C. D., Messina C. R., Whitlock E., Sato A. and Hunt J. R. (2007). "Association between cigarette smoking and colorectal cancer in the Women's Health Initiative." Journal of the National Cancer Institute. 99(22):1729–1735.
- Pegg A. E. (2006). "Regulation of ornithine decarboxylase." The Journal of Biological Chemistry. 281(21):14529-14532.
- Qin C., Samudio I., Ngwenya S. and Safe S. (2004) "Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways."Molecular Carcinogenesis 40: 160-170.

-
- Ransohoff D. F. and Lang C. A. (1991). "Screening for colorectal cancer." The New England Journal of Medicine. 325(1): 37-41.
- Rice T. W., Blackstone E. H. and Rusch V. W. (2010). "7th edition of the AJCC cancer staging manual: esophagus and esophagogastric junction." Annals of Surgical Oncology. 17: 1721-1724.
- Rozen S. and Skaletsky H. J. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sambrook J. and Russell D. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Secretaría de Salud. (2008). Programa de Acción específico 2007-2012. Cáncer de mama. Documento revisado enero 2011.
<http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos/cancer-de-mama.html>
- Shantz L. M. (2004). "Transcriptional and translational control of ornithine decarboxylase during Ras transformation." Biochemistry Journal. 377: 257-264.
- Schipper R. G. and Verhofstad A. J. (2002). "Distribution Patterns of Ornithine Decarboxylase in Cells and Tissues: facts, Problems, and Postulates." Histochemistry y Cytochemistry. 50 (9): 1143-1160.
- Smith R. A., von Eschenbach A. C., Wender R., Levin B., Byers T., Rothenberger D., Brooks D., Creasman W., Cohen C., Runowicz C., Saslow D., Cokkinides V. and Eyre H. (2001). "American cancer society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancer." C A: A Cancer Journal For Clinicians. 51: 38-75.
- Thorson A. G., Knezetic J. A. and Lynch H. T. (1999). "A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome)." Diseases of the Colon e Rectum. 42(1):1-9.
- Towbin H. and Gordon, J. (1984.) "Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook." Journal of Immunological Methods. 72(2):313-40.
- Vallone P. M. and Butler J. M. (2004). "AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures." BioTechniques. 37:226-231.
- Wallace H. M. and Caslake R. (2001). "Polyamines and colon cancer." European Journal of Gastroenterology & Hepatology. 13:1033-1039.

-
- Wallon U.M., Persson L. and Heby O. (1995). "Regulation of ornithine decarboxylase during cell growth. Changes in the stability and translatability of the mRNA, and in the turnover of the protein." Molecular and Cellular Biochemistry. 146: 39-44.
- Willey J. C., Crawford E. L., Knight C. R., Warner K. A., Motten C. A., Hemess E. A., Zahorchak R. J., and Graves T. G. (2002). "Gene Expression Profiling" Methods and Protocols Methods in Molecular Biology, vol. 258: Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Winawer S. J., Krabshuis J., Lambert R., O'Brien M. and Fried M. (2011). "Cascade colorectal cancer screening guidelines: a global conceptual model." Journal of Clinical Gastroenterology. 45(4):297-300.
- Yuan Q., Ray R. M., Viar M. J. and Johnson L. R. (2001). "Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells." American Journal of Physiology Gastrointestinal. 1:G130-8.
- Zhao B. and Butler A. P. (2001). "Core promoter involvement in the induction of rat ornithine decarboxylase by phorbol esters." Molecular Carcinogenesis. 32 (2): 92-9.