

# Patología molecular

## Estudio de las mutaciones c-K-ras en tumores ováricos: una aplicación concreta de la patología molecular

M. Cuatrecasas<sup>1</sup>, X. Matías-Guiu<sup>2</sup> y J. Prat<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Sant Jaume, Calella. <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Sant Pau, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

### INTRODUCCIÓN

#### Características clinicopatológicas del cáncer de ovario

El cáncer de ovario representa el 25% de las neoplasias ginecológicas. En España su frecuencia relativa es del 3,7%; sin embargo, es la causa más frecuente de muerte por neoplasias del tracto genital femenino. Este pronóstico adverso se debe a que su localización anatómica no permite establecer un diagnóstico precoz y suele diagnosticarse en estadios avanzados, cuando el tumor ya se ha diseminado por la cavidad peritoneal y las medidas terapéuticas existentes resultan ineficaces. Además, la progresión del epitelio ovárico normal a tumoral así como los mecanismos genéticos moleculares causantes de su desarrollo son poco conocidos (1, 2). A esto hay que añadir que las alteraciones genéticas más comunes en otras neoplasias no resultan aplicables a la mayoría de carcinomas ováricos.

Histogenéticamente, los tumores epiteliales del ovario se originan en el epitelio de superficie y representan el 60% de los tumores primarios y el 80% a 90% de los malignos. Existen distintos tipos histológicos y pueden tener varios grados de agresividad biológica: benignos, de bajo potencial de malignidad (*borderline*) y malignos. Se acepta la hipótesis de que la transformación maligna del epitelio de superficie ocurre a partir de los quistes epiteliales de inclusión que se forman tras múltiples ovulaciones (3, 4). Así, bajo la influencia de estímulos oncogénicos el epitelio benigno atrapado se transformaría en maligno e invasivo (5, 6). Sin embargo, ocasionalmente ciertos tumores benignos y *borderline* pueden ser precursores de los carcinomas (3).

Característicamente, los tumores epiteliales ováricos son neoplasias muy heterogéneas, con variación en el tipo, composición y grado de malignidad. Es frecuente observar componentes de distinto gra-

do histológico dentro del mismo tumor, sobre todo cuando se trata de tumores serosos y mucinosos (7).

### Factores de riesgo y alteraciones genéticas en los tumores de ovario

Entre los factores de riesgo de cáncer de ovario aceptados se incluyen el genético, la baja o nuliparidad y la edad. La herencia parece tener un papel importante en menos del 5% de estos tumores. Existen tres síndromes de carcinoma de ovario familiar: el carcinoma de ovario familiar aislado, el cáncer de mama/ovario familiar y el carcinoma de ovario en el contexto de cáncer de colon familiar no asociado a poliposis o síndrome de Lynch tipo II. En los carcinomas ováricos esporádicos no se ha observado una alteración genética específica, y parecen resultar de un proceso complejo que incluye la acción de numerosos oncogenes y genes supresores tumorales (2, 8-10). En los casos familiares, a diferencia de los esporádicos, la toma de anticonceptivos orales parece asociarse a un mayor riesgo de cáncer. Por el contrario, la nuliparidad es un factor protector (11). Estos datos sugieren que las mujeres con alto riesgo por factores genéticos pueden afectarse de distinta manera según su ambiente hormonal u otros factores ambientales, dietéticos o estilo de vida. Ello permitiría controlar y manipular los factores de riesgo externos modificables, investigar su efecto sobre cada genotipo y evaluar el riesgo de una determinada persona a desarrollar una neoplasia.

Las alteraciones genéticas que participan en el desarrollo de un tumor son numerosas. Los cambios moleculares más útiles para el diagnóstico son los relacionados con la iniciación y la progresión tumoral, pues permiten establecer un diagnóstico precoz, justifican el tratamiento de las pacientes con alto riesgo, e identifican los tumores con mayor agresividad biológica (15).

Las alteraciones genéticas que ocurren durante la tumorigénesis ovárica se han ido conociendo gracias a la aplicación de las técnicas de patología molecular a la práctica clínica. Por ejemplo, las alteraciones del gen supresor *p53* confieren una ventaja de crecimiento selectiva durante la progresión tumoral y se detectan durante el desarrollo de

los tumores de alto grado (13). Las mutaciones del gen *p53* se encuentran en el 50% de los carcinomas de alto grado (III/IV) y en el 15% de los de grados I/II. El gen supresor tumoral *BRCA1* está implicado en la mayoría de los casos del síndrome del carcinoma ovárico familiar aislado y en los de carcinoma de mama/ovario familiar, en los que también participa el gen *BRCA2*. Por otra parte, en el síndrome de Lynch tipo II se ha observado inestabilidad de microsatélites en el gen *hMSH2*. La inestabilidad de microsatélites consiste en anomalías en la longitud de secuencias repetitivas cortas del DNA y resulta de la alteración de los genes causantes de la reparación del DNA (los *mismatch repair genes* *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*) (10, 12, 14, 16). Además, se ha detectado la amplificación y sobreexpresión del gen *c-erb2 (Her2/neu)* en el 30% de carcinomas ováricos, lo cual se relaciona con un peor pronóstico, sobre todo en pacientes con carcinomas de ovario familiar (supervivencias del 67% a los 5 años frente al 17% en los casos esporádicos) (15). Recientemente se ha observado que las alteraciones en los genes *p15* y *p16* pueden contribuir en la génesis de los tumores epiteliales del ovario (17, 18). También se ha visto que la activación mutacional del gen *c-K-ras* tiene un papel selectivo en el desarrollo de los tumores ováricos de tipo mucinoso, probablemente durante la fase inicial de este proceso, al igual que ocurre en los tumores de colon y páncreas (19, 20). De la misma manera, la pérdida de expresión del gen supresor de metástasis *nm23*, con disminución de las concentraciones de proteína nm23H1, causaría progresión tumoral y podría asociarse a mal pronóstico. También se ha demostrado la amplificación del gen *MDM2*, con el consiguiente aumento de la proteína MDM2 producto del gen, que inactiva el gen supresor *p53*, al formar complejos con la proteína p53.

Los carcinomas ováricos familiares y no familiares tienen características clinicopatológicas distintas. Por ejemplo, se han descrito más cistoadenocarcinomas serosos papilares y menos tumores mucinosos y *borderline* en las pacientes con carcinoma ovárico familiar (21, 22). Además, los tumores familiares suelen aparecer en edades más tempranas que los esporádicos.

En el estudio genético deben tenerse en cuenta las características histológicas de los tumores; ya que el cáncer de ovario es típicamente heterogéneo. Existe una gran variedad de tipos histológicos que tienen un comportamiento biológico distinto. También debe determinarse la presencia de más de un componente en un mismo tumor, los porcentajes de los distintos tipos tumorales o si coexisten lesiones de bajo grado con otras de alto grado. Sólo la integración de los datos moleculares con las características patológicas de los tumores, tales como el tipo, el grado histológico, el estadio, los rasgos inmunohistoquímicos y el índice de DNA, entre otros, permitirá obtener una visión real de la trascendencia de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis.

### PROTOONCOGÉN c-K-ras

El protooncogén c-K-ras pertenece a la familia de multigenes *ras* que consta de tres genes íntimamente relacionados: Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras. Los dos primeros son los homólogos celulares normales de los oncogenes virales de los virus del sarcoma murino Harvey y Kirsten. N-ras se descubrió como un oncogén transformante del DNA en una línea celular de neuroblastoma. Los genes *ras* participan en la transmisión de señales de crecimiento y diferenciación celular normal. Son capaces de inducir la transformación maligna *in vitro* en células de líneas celulares, pero no *in vivo*, y son biológicamente activos en células heterólogas de otras especies al estar altamente conservados en la escala evolutiva desde las levaduras hasta los mamíferos. Los genes *ras* están localizados en diferentes cromosomas y son de distinto tamaño: c-K-ras tiene más de 40 kb de longitud, N-ras 10 kb y c-Ha-ras menos de 6 kb. El mecanismo más frecuente de activación son las mutaciones puntuales, sobre todo en los codones 12, 13, 61, 59 y 63. Estas mutaciones provocan la activación de la proteína producto del gen, con pérdida de la actividad GTPasa intrínseca.

### Proteínas Ras: estructura y función

El producto de los genes *ras* son las proteínas Ras, Mr 21.000 (p21). Las secuencias codificadoras de

las proteínas Ras son muy similares incluso entre distintas especies. Las proteínas Ras son miembros de una superfamilia de proteínas con actividad GTPasa que incluye las proteínas Ras, Rho/Rac, Ran, Rab y Arf. Intervienen en la síntesis de proteínas (factores de elongación e iniciación) y en la vía de transducción de señales que controlan el crecimiento y diferenciación celular. Están localizadas en la superficie interna de la membrana plasmática, unen de forma no covalente pero con alta afinidad nucleótidos de guanina (GDP y GTP), y tienen actividad GTPasa intrínseca. Actúan como mediadores de la señal entre los receptores tirosincinasa de la superficie celular y la cascada de serina/treonincinasas que activa la expresión de factores nucleares, que en último término controla la expresión génica y la síntesis de proteínas (24, 25). Este mecanismo de activación transcripcional celular, inducido por factores de crecimiento u otras interacciones ligando-receptor y mediado por las proteínas Ras, es fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Así, las proteínas Ras actúan como una subunidad reguladora de un complejo asociado de membrana con actividad enzimática (23, 26).

Cada gen *ras* codifica un producto de traducción primario, de 189 aminoácidos, con codones distribuidos en cuatro exones. El gen c-K-ras se diferencia por contener dos exones 4 (4A y 4B), con distinto *splicing*, que resulta en proteínas de 188 aminoácidos, con el dominio C-terminal codificado por el exón 4A o 4B.

La estructura de las proteínas Ras está dividida en cuatro regiones o dominios:

- Dominio de unión a nucleótidos de guanina: los primeros 165 aminoácidos unen el grupo purina GTP y son causantes de la especificidad de la unión a los nucleótidos de guanina. Las mutaciones en este dominio disminuyen la afinidad de las proteínas Ras, alteran la especificidad de la unión de nucleótidos y aumentan el AMPc.
- Región variable o heterogénea mayor: corresponde a los aminoácidos 165-185, variable entre distintas especies. No se modifica con el cambio conformacional de la proteína activa e inactiva.
- Región efectora o dominio catalítico: segmento N-terminal que comprende los aminoácidos 32-

40. Regula las actividades bioquímicas de las proteínas Ras y es necesario para la transmisión de señales y para la actividad transformante. Esta región interacciona con proteínas moduladoras y efectoras, es idéntica en distintas especies y su conformación varía en estado activo e inactivo. Las mutaciones en este dominio no activan la adenilatociclasa.

- Dominio de unión a membrana: es el extremo C-terminal, esencial para la localización de membrana y la actividad oncogénica de las proteínas Ras.

### Moduladores y efectores de las proteínas Ras

La actividad de las proteínas Ras está regulada por tres clases distintas de proteínas que modulan la asociación entre las proteínas Ras y los nucleótidos de guanina (27). Las proteínas Ras unidas al GTP son funcionalmente activas, e inactivas unidas al GDP. Tienen actividad GTPasa y propiedades intercambiadoras entre los nucleótidos GDP/GTP intrínsecas. Estas actividades no son suficientes para regular el rápido y transitorio ciclo entre los nucleótidos GDP/GTP que se induce durante la estimulación mitógena (28), sino que están catalizadas por la familia de factores liberadores de guanina (GRF), inhibidas por las proteínas inhibidoras de la disociación de guanina (GDI) y aceleradas por las proteínas activadoras de la GTPasa (GAP), que hidrolizan el GTP a GDP, finalizando la señal de transducción (29-31). Otros moduladores de las proteínas Ras son Raf-1, AMPc, PI(3)K (32-34); receptores esteroideos (oncoproteína *erbA*); productos de oncogenes (*dbl* y *etc2*) y genes supresores tumorales (*NF2*); *nm23* y la subunidad estimuladora de la proteína G (*GαS*).

### Mutaciones *ras* en tumores humanos

La activación mutacional de los genes *ras* es un fenómeno muy frecuente en muchos pero no en todos los tipos tumorales humanos, aunque su papel biológico todavía no está dilucidado. La incidencia, el

**Tabla 1. Incidencia de mutaciones del gen *ras* en tumores humanos.**

| Tipo de tumor                | Incidencia (%) | Gen <i>ras</i> activado predominante            |
|------------------------------|----------------|---|
| Adenocarcinoma de colon      | 70-90          | Ki- <i>ras</i>                                  |
| Carcinoma de páncreas        | 90             | Ki- <i>ras</i>                                  |
| Colangiocarcinoma            | 70-90          | Ki- <i>ras</i>                                  |
| Endometrio                   | 50             | Ki- <i>ras</i>                                  |
| Adenocarcinoma de pulmón     | 30             | Ki- <i>ras</i>                                  |
| Seminoma                     | 40             | Ki- <i>ras</i> , N- <i>ras</i>                  |
| Melanoma                     | 20             | N- <i>ras</i>                                   |
| Carcinoma de vejiga urinaria | 6              | Ha- <i>ras</i>                                  |
| Tiroides                     | 50             | Ha- <i>ras</i> , Ki- <i>ras</i> , N- <i>ras</i> |
| Mielodisplasia mieloide      | 30             | N- <i>ras</i>                                   |
| Leucemia mieloide aguda      | 30             | N- <i>ras</i>                                   |
| Leucemia mieloide crónica    | 10             | N- <i>ras</i>                                   |
| Leucemia linfática crónica   | 10             | N- <i>ras</i>                                   |

gen *ras* implicado y la mutación observada varían según el tipo histológico y la localización del tumor. En distintos tipos de neoplasias predominan mutaciones de un determinado oncogén *ras* (K-*ras* en distintos tipos de carcinomas; N-*ras* en leucemias) (Tabla 1). Sin embargo, no es cierto que la activación de genes *ras* refleje la expresión tejido-específica de las formas protooncogénicas en las células normales precursoras del tumor. Hay distintos genes *ras* con diferentes funciones. La prevalencia de mutaciones c-K-*ras* es del 70% al 90% en adenocarcinomas del páncreas exocrino, colorrectales y colangiocarcinomas, del 50% en carcinomas de endometrio y tiroides, del 50% en adenomas colorrectales y del 39% en carcinomas pulmonares, excluyendo los de célula pequeña (19, 20, 35, 36). La frecuencia de mutaciones es muy baja (<5%) o inexistente en los carcinomas de mama, cérvix uterino, esófago, glioblastoma, neuroblastoma, estómago, pulmón (carcinoma escamoso y de célula grande) y en gran parte de los procesos hematológicos y linfoides. En las leucemias observamos mutaciones N-*ras*. En algunas leucemias mieloides agudas y linfáticas crónicas se han detectado dos mutaciones *ras* distintas en el DNA del mismo paciente, causantes del crecimiento clonal de dos líneas celulares tumorales independientes derivadas de una población preleucémica común. Estudios *in vivo* e *in vitro*, en modelos experimentales animales y en tumores humanos, han demostrado

que las mutaciones *ras* no son letales ni por sí solas oncogénicas. Su presencia no es imprescindible para la carcinogénesis y en la mayoría de tumores en que se detectan no tienen implicaciones diagnósticas ni pronósticas claras que puedan ser útiles en un contexto clínico. La activación *ras* no es el factor iniciador de la neoplasia, pero contribuye a su progresión tardía, al ser uno de los pasos interactivos de la progresión del fenotipo normal a tumoral. Hay distintas vías de transformación maligna y el oncogén *ras* se encuentra en una de las más frecuentes (7, 37, 38). No obstante, en modelos animales experimentales con tumores inducidos por carcinógenos las mutaciones *ras* son un fenómeno iniciador equivalente al primer paso en la progresión tumoral (41) (por ejemplo nitrosometilurea y carcinoma de mama en ratas). Los genes *ras* son dianas directas de las moléculas carcinógenas, demostrándose la relación entre agentes carcinógenos externos y mutaciones *ras* (42).

La presencia de genes *ras* activados no está relacionada con el grado ni con el estadio tumoral. Se han detectado mutaciones *ras* en lesiones benignas, premalignas y en carcinomas. La incidencia de mutaciones *ras* es similar en adenomas y en carcinomas colorrectales. Además, la identificación de mutaciones *ras* tanto en adenomas de colon como en hiperplasias pancreáticas ha sugerido que en algunas neoplasias la activación *ras* representa un

fenómeno genético inicial en el proceso de carcinogénesis (39, 40).

### Mutaciones *ras* en tumores ováricos

Las mutaciones en el gen c-K-*ras* son muy frecuentes en las neoplasias con diferenciación mucinosa, incluyendo los tumores ováricos de este tipo (43, 44). En la mayoría de adenocarcinomas, más del 90% de las mutaciones *ras* ocurren en el gen c-K-*ras*, el 80% en el codón 12, y son poco frecuentes en los codones 13, 61, 59 y 63 (19). Por el contrario, en los adenomas y carcinomas colorrectales se ha detectado una alta proporción de mutaciones en el codón 13. Se ha descrito una relación entre mutaciones c-K-*ras* y los estadios tumorales avanzados, sobre todo en los tumores no mucinosos del ovario, en los que la prevalencia de estas mutaciones es menor que en los mucinosos (45-47).

### ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES c-K-*ras*: MÉTODOS

#### Extracción de DNA

El método de extracción de DNA se realizó a partir de tejido incluido en parafina (Fig. 1). De cada bloque se practicó un corte de 5 µm de grosor que se

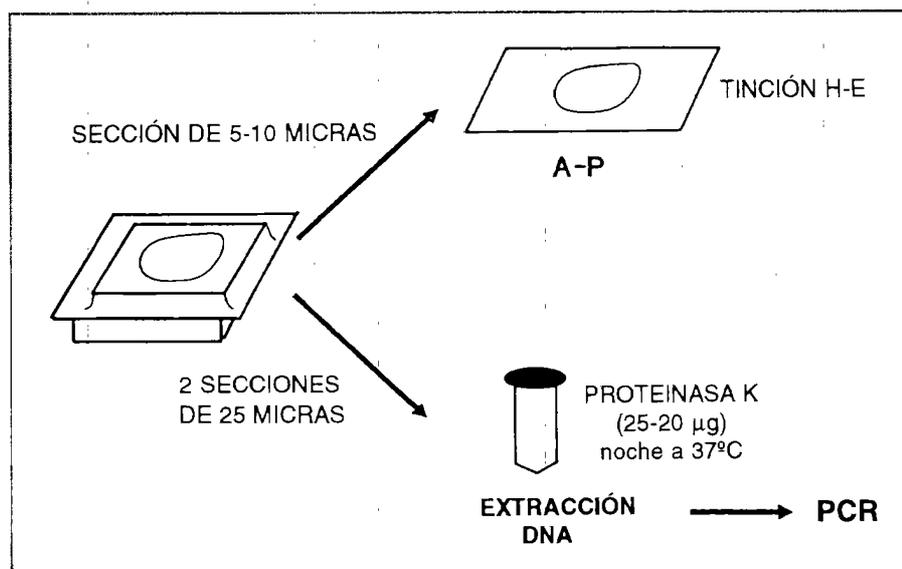


Figura 1. Extracción del DNA a partir de material parafinado (véase texto).

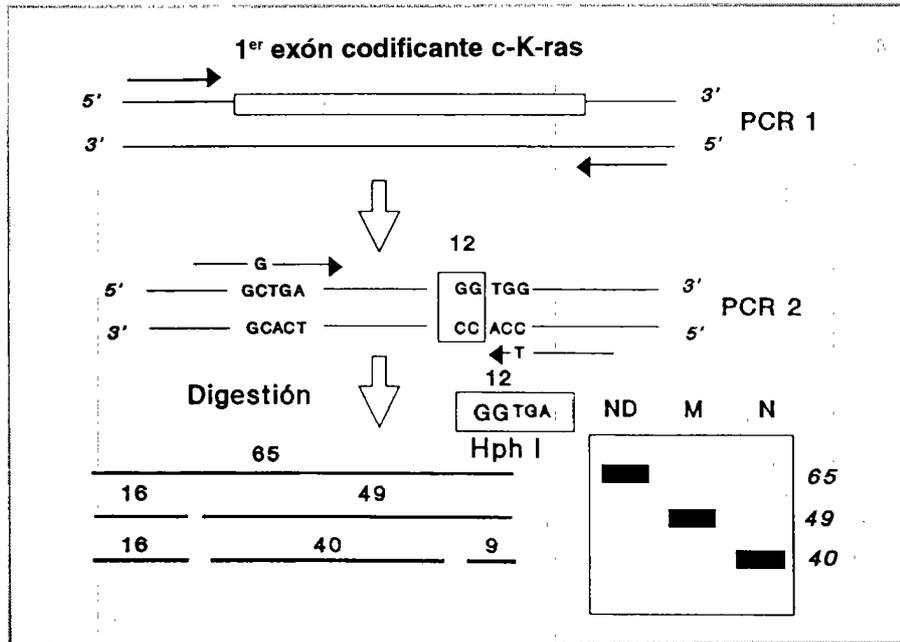
tiñó con HE. Esta sección sirvió de control de la presencia de tumor, y en aquellos casos con componentes de distinto grado histológico en un mismo tumor sirvió de control para la selección y microdissección por separado de las distintas áreas. Del mismo bloque de parafina se practicaron dos secciones de 25 µm de grosor, que se introdujeron en un tubo de microcentrífuga para la extracción del DNA. Para evitar contaminaciones se cambió la cuchilla del micrótopo entre caso y caso y se limpió con alcohol antes y después de cortar cada bloque. En aquellos tumores con más de una área seleccionada (por ejemplo tumores mucinosos con áreas de distinto grado histológico), se utilizó la técnica de microdissección bajo control microscópico que se describe a continuación. Se cortaron siete secciones de 5 µm de grosor, que se depositaron sobre portaobjetos. El agua del baño se limpió con servilletas después de cada caso. Los cortes se mantuvieron 30 minutos a 55 °C y se desparafinaron con dos cambios de xilol y etanol absoluto; se rehidrataron con tampón 50 mM Tris (pH 8,5) con 0,9% de ClNa y 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético. Las áreas tumorales se rascaron con una lanceta bajo control microscópico. La sección teñida con HE sirvió para identificar las zonas diana. Tras la microdissección, el tejido tumoral se depositó en un tubo de microcentrífuga con 600 µl del mismo tampón con dodecilsulfato sódico al 1% y 0,2 mg/ml de proteinasa K añadidos. El tejido se incubó 72 horas a 37 °C, añadiendo 0,2 mg/ml de proteinasa K diariamente. Se inactivó la proteinasa K por ebullición (10 minutos a 100 °C). Se extrajo el DNA con fenol:cloroformo y cloroformo. Se precipitó con acetato sódico e isopropanol y se resuspendió en 10 µl de agua desionizada. Se utilizó 1 µg de ácido nucleico para amplificar mediante PCR. Los controles de DNA mutado se obtuvieron de líneas celulares establecidas de cáncer de páncreas (Capan-1, ASPC-1 y Mia Paca) y de cáncer de pulmón (A549, American Type Culture Collection, Rockville, MD), con mutaciones puntuales homocigotas en el codón 12 del gen *c-K-ras*, y de una línea celular de cáncer de colon (LoVo), con una mutación puntual homocigota en el codón 13 del gen *c-K-ras*.

### Amplificación del DNA y detección de mutaciones mediante PCR/RFLP

La detección de mutaciones en los codones 12 y 13 del gen *c-K-ras* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR/RFLP). Se utilizaron distintos cebadores para detectar las mutaciones puntuales en los codones 12 y 13, respectivamente. El procedimiento general para detectar cualquier mutación en ambos codones está esquematizado en la Fig. 2. Las secuencias de DNA del primer exón codificante del gen *c-K-ras* se amplifican en una primera PCR usando un par de cebadores externos al mismo (PCR-1). Tras esta primera amplificación, se utiliza 1 µl del producto de la PCR-1 y se reamplifica mediante una segunda PCR anidada (*nested*) (PCR-2), utilizando un par de cebadores más cercanos a los codones 12 y 13 del gen *c-K-ras*. La característica de esta segunda PCR es que los cebadores contienen una mutación introducida de forma artificial, de manera que se crean dos sitios o dianas de restricción. El *primer upstream* nos introduce una diana de restricción que nos sirve de control interno de la digestión enzimática posterior, y el *primer downstream* crea una segunda diana de restricción que se pierde siempre que haya mutaciones en las dos primeras bases del codón 12 o 13 del gen *c-K-ras*. Posteriormente, el producto amplificado de la PCR-2 se digiere con enzimas de restricción adecuadas según se trate del codón 12 o 13 (*HphI* y *BstNI* para el codón 12; *HaeIII* para el 13). Estas enzimas reconocen las secuencias de las dianas de restricción creadas de forma artificial en la PCR-2. El producto de la digestión enzimática se separa por electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% (2 horas a 200 V), que se tiñen con bromuro de etidio y posteriormente se fotografían. El patrón de bandas de los geles en cada uno de los casos es diagnóstico de la presencia o ausencia de la mutación.

### Caracterización de las mutaciones K-ras

Una vez detectada una mutación puntual en el codón 12, se caracterizó mediante PCR/RFLP. Se uti-



**Figura 2.** Representación esquemática del método PCR/RFLP (véase texto). En este ejemplo, la banda de 65 pares de bases (pb) corresponde al DNA amplificado, producto de la PCR-2 previa digestión enzimática. Las bandas de 49 pb y de 40 pb corresponden al alelo mutado y al alelo no mutado, respectivamente.

liza 1 µl del producto de la PCR-1 y se reamplifica con distintos pares de cebadores mutados para saber qué base está sustituida por otra en la cadena de DNA. Los fragmentos amplificados resultantes se digieren con enzimas de restricción adecuadas (*HincII* para valina, *MaeI* para serina, *SacI* para arginina, *HphI* para ácido aspártico e *HindIII* para cisteína), lo que nos permite detectar el cambio exacto de cada mutación puntual. Las muestras se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% (2 horas a 200 V), se tiñen con bromuro de etidio y se fotografían. El patrón de bandas nos indica la presencia de las distintas mutaciones. Utilizamos controles positivos de líneas celulares tumorales establecidas (ASPC-1 para el cambio de glicina a ácido aspártico, Capan-2 para valina y Mia Paca para mutaciones de cisteína), así como de tumores previamente secuenciados con mutaciones específicas. De esta manera, se caracterizaron cinco aminoácidos distintos (serina, cisteína, valina, ácido aspártico y alanina), sin necesidad de utilizar isótopos radiactivos. Los cambios no detectados mediante este método se secuenciaron.

## APLICACIONES CONCRETAS DE LAS MUTACIONES c-K-ras EN TUMORES OVÁRICOS

### Tumores sincrónicos

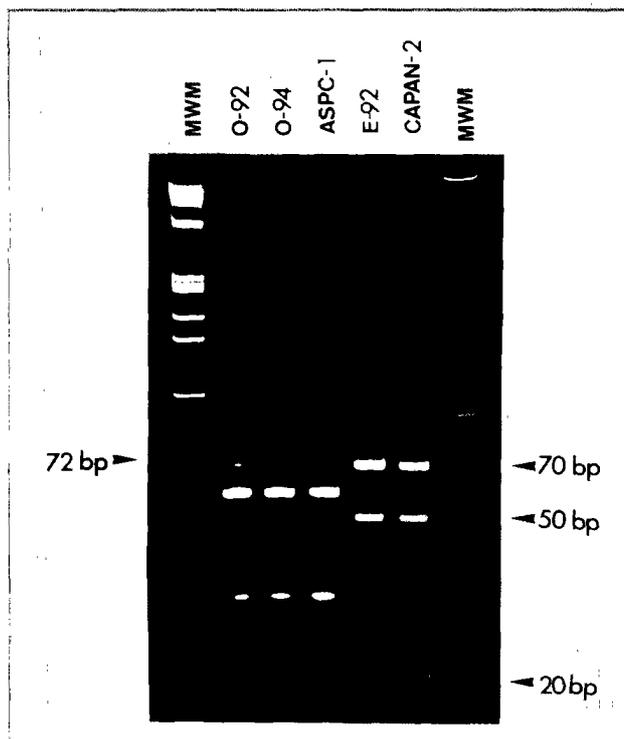
La histogénesis de los tumores sincrónicos ha sido objeto de controversia (48-55) debido a la dificultad de determinar con exactitud su naturaleza única o múltiple (primaria o metastásica) exclusivamente mediante las características clinicopatológicas (localización, tamaño, tipo histológico) y otras técnicas especiales como la inmunohistoquímica o la microscopía electrónica. El diagnóstico correcto de estos tumores es importante, ya que de él depende la aplicación de un tratamiento eficaz. La aplicación de las técnicas de patología molecular podría ayudar al diagnóstico y manejo de estas pacientes, ofreciéndoles enfoques terapéuticos individualizados y adecuados (56-62) especialmente en casos de tumores sincrónicos, con el fin de distinguir la naturaleza multicéntrica o metastásica de los mismos. Algunos autores (58) realizaron tinciones de inmunohistoquímica y estudiaron el cariotipo en muestras de tumores mucinosos del ovario, apéndice

ce cecal y pseudomixoma peritoneal. Concluyeron que las lesiones peritoneales eran metastásicas y que no se trataba de un proceso neoplásico multifocal, al encontrar cambios en los cromosomas 5 y 15 en todas las muestras de cada una de las pacientes. Fujita y cols. (62) utilizaron el análisis de clonalidad para diferenciar tumores sincrónicos primarios de endometrio y ovario de los metastásicos. Pilotti y cols. (59) identificaron la misma mutación *ras* en un carcinoma folicular de tiroides y su metástasis ósea. Así mismo, Losi y cols. (56) detectaron la misma mutación *ras* en tumores colorrectales y en sus metástasis o recidivas locales. Sin embargo, Sugio y cols. (60) detectaron distintas mutaciones en el gen *c-K-ras* en dos carcinomas pulmonares metacrónicos de un mismo paciente, concluyendo que se trataba de dos tumores distintos. En otro estudio Terunuma y cols. (57) encontraron distintas mutaciones *ras* en cinco tumores de colon simultáneos de un mismo paciente. Finalmente, Chuaqui y cols. (61) intentaron determinar el origen de tumores sincrónicos del ovario y del apéndice cecal histológicamente similares mediante el análisis de los microsatélites de los cromosomas 17q (*nm23*), 3p (*VHL*) y 5q (locus *D5S346*) y demostraron la utilidad de estas técnicas para diferenciar los tumores independientes de los metastásicos.

Las metástasis ováricas mucinosas suelen originarse en colon, estómago, páncreas y tracto biliar, y simulan tumores mucinosos primarios del ovario. A menudo resulta difícil determinar el origen de estos tumores, sobre todo si se desconoce la presencia de un tumor primario extraovárico (63, 64).

Recientemente (65) estudiamos una paciente con dos tumores sincrónicos: uno seroso papilar *border-line* en el ovario y un adenocarcinoma de endometrio de bajo grado. Ambos tumores tenían una mutación en el codón 12 del gen *c-K-ras*, cuya caracterización demostró que se trataba de mutaciones distintas, con una transición de glicina a ácido aspártico [GGT>GAT (Gly>Asp)] en el ovario y una transversión de glicina a valina [GGT>GTT (Gly>Val)] en el endometrio (Fig. 3), lo que confirmó que se trataba de dos neoplasias independientes y no de un mismo tumor metastásico.

Los tumores mucinosos sincrónicos del ovario y del apéndice cecal asociados a pseudomixoma pe-



**Figura 3.** Análisis de mutaciones puntuales en el codón 12 por PRC/RFLP. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Calle 1: marcador de peso molecular (MWM),  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae*III DNA Ladder (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.). O: ovario. E: endometrio. Calle 4: ASPC-1, control positivo para transición GGT→GAT (la línea celular ASPC-1 es homocigota para esta mutación). Calle 6: CAPAN-2: control positivo para la transversión GGT→GTT (la línea celular CAPAN-2 es heterocigota para esta mutación). Calle 7: marcador de peso molecular (MWM), 10 bp DNA Ladder (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.). El tumor ovárico O-92 presentó una transición GGT→GAT (Gly→Asp), como muestra la banda de 56 pb correspondiente al alelo mutado. El tumor endometrial E-92 de la misma paciente presentó una transversión GGT→GTT (Gly→Val). El fragmento de 68 pb representa el alelo normal (GTT), el de 48 pb el alelo mutado (GTT) y el fragmento de 20 pb es el control de la digestión enzimática. El tumor ovárico O-94 corresponde a otra paciente con una transición GGT→GAT (Gly→Asp).

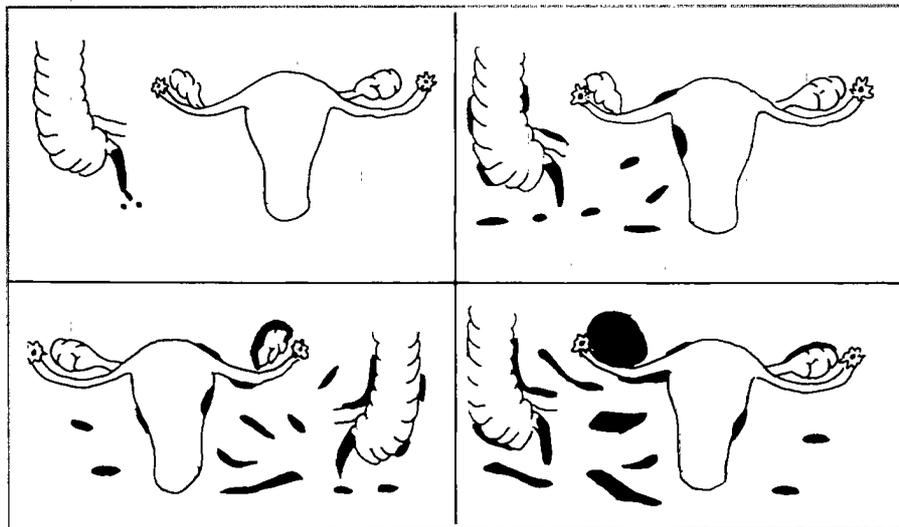
ritoneal se han considerado tradicionalmente neoplasias independientes (48, 49, 52, 54) según datos clínicos y patológicos tales como el tamaño del tumor ovárico, la falta de evidencia macro o microscópica de rotura de la pared apendicular, la presentación del tumor apendicular meses o años después del tumor ovárico, el aspecto benigno del componente epitelial, la presencia de distintos grados histológicos en ambas localizaciones, la menor agre-

sividad biológica de estos tumores que la esperada en tumores metastásicos, y el patrón inmunohistoquímico discordante entre el epitelio ovárico y apendicular. Algunos autores sugieren que estas neoplasias representan un tumor primario multifocal, resultado de un efecto oncogénico de campo de tipo colónico que afectaría al epitelio (54). Otros investigadores han sugerido el origen secundario o metastásico de los tumores ováricos (50, 51, 55) basándose en datos clínicos y patológicos. Los argumentos a favor de un tumor primario apendicular con metástasis al ovario y diseminación peritoneal son: la frecuente presentación sincrónica de los tumores ováricos y apendiculares, el tumor apendicular parece primario; la presencia de pseudomixoma peritoneal en prácticamente todas las pacientes, la bilateralidad o el predominio derecho, el pequeño tamaño de los tumores ováricos, la presencia de implantes ováricos superficiales, la presencia de pseudomixoma ovárico, la semejanza histológica entre ambos tumores y la histología de aspecto benigno en las metástasis ováricas de algunos carcinomas del páncreas o del colon. La secuencia evolutiva de estos tumores está representada en la Fig. 4.

Las características clinicopatológicas de las 6 pacientes estudiadas con tumores sincrónicos del ovario y apéndice cecal asociados a pseudomixoma

peritoneal (66) se resumen en la Tabla 2. Las edades estaban comprendidas entre 46 y 67 años. Cinco de las 6 pacientes tenían tumores del mismo aspecto histológico en ambas localizaciones, siendo en cuatro tumores mucinosos *borderline* y en una un carcinoma mucinoso. En la paciente número 1 observamos una discordancia, con un tumor *borderline* en el apéndice cecal y un carcinoma de bajo grado en el ovario. Tres tumores ováricos eran derechos y dos bilaterales. Todas las pacientes presentaron pseudomixoma peritoneal y en el seguimiento dos habían muerto por tumor a los 5 y 7 años, respectivamente, mientras que cuatro entre 2 y 11 años estaban vivas con tumor.

Los resultados del análisis de las mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 del gen c-K-ras en los 12 tumores de las 6 pacientes con tumores mucinosos sincrónicos del ovario y apéndice cecal, demostraron mutaciones en el codón 12 en 5 pacientes, tanto en el ovario como en el apéndice cecal por separado. Una paciente no presentó mutaciones en ninguna de las dos localizaciones. No se detectaron mutaciones en el codón 13. La caracterización de las mutaciones demostró, en cada uno de los casos, el mismo tipo de cambio en ambos tumores, ovárico y apendicular: una transición de glicina a ácido aspártico [GGT>GAT (Gly>Asp)]



**Figura 4.** Inicialmente el tumor mucinoso apendicular distiende la luz y diseca la pared apendicular con salida de moco y células a la cavidad abdominal. Posteriormente se forman implantes peritoneales, en la superficie serosa de órganos adyacentes y de los ovarios derecho e izquierdo. Finalmente, el tamaño del tumor ovárico derecho resultante suele ser mayor que el del tumor apendicular, que puede tener aspecto macroscópico normal tras distenderse y vaciar el contenido a la cavidad abdominal.

Tabla 2. Tumores mucinosos del ovario y apéndice cecal.

| Caso | Edad (años) | Apéndice | Ovario | Peritoneo | Seguimiento (años) |
|------|-------------|----------|--------|-----------|--------------------|
| 1    | 51          | TB       | Ca (D) | PP        | †T (5)             |
| 2    | 46          | TB       | TB (I) | PP        | †T (7)             |
| 3    | 64          | TB       | TB (B) | PP        | VCT (11)           |
| 4    | 67          | Ca       | Ca (D) | PP        | VCT (2)            |
| 5    | 49          | TB       | TB (B) | PP        | VCT (2)            |
| 6    | 57          | TB       | TB (D) | PP        | VCT (8)            |

TB: tumor *borderline*; Ca: adenocarcinoma; D: derecho; I: izquierdo; B: bilateral; PP: pseudomixoma peritoneal; †T: muerte por tumor; VCT: vivo con tumor.

en 4 pacientes y una transversión de glicina a valina [GGT>GTT (Gly>Val)] en una. El resultado de los hallazgos moleculares se resume en la Tabla 3, con una concordancia en el patrón mutacional en el 100% de los casos: concordancia negativa por ausencia de mutaciones en el caso número 1, y positiva en los casos 2 al 6 por la presencia de la misma mutación en ambas localizaciones. Estos resultados sugieren el origen de estos tumores en una única clona celular y, por lo tanto, la naturaleza metastásica de los mismos. A la luz de los datos clínicos, parece tratarse de tumores primarios del apéndice cecal.

Estos hallazgos sugieren la importancia de la aplicación de las técnicas de patología molecular al diagnóstico diferencial entre carcinomas sincrónicos independientes y carcinomas metastásicos.

### Tumores mucinosos

Las alteraciones genéticas estudiadas inicialmente en los carcinomas de ovario incluyen la familia de

protooncogenes *ras* (c-Ha-*ras*, c-Ki-*ras* y N-*ras*) y el gen supresor tumoral *p53* (43, 45, 67). En los primeros trabajos, las mutaciones o amplificaciones del gen *ras* se consideraron muy poco frecuentes en carcinomas de ovario, con incidencias combinadas del 5% al 10% (68, 69). Sin embargo, al analizar las mutaciones c-K-*ras* en los distintos tipos histológicos de tumores epiteliales ováricos, varios investigadores observaron que eran mucho más frecuentes en tumores de tipo mucinoso que en otros tipos histológicos (46, 47). Algunos autores (70) detectaron mutaciones en el 75% de tumores mucinosos frente al 14% en los no mucinosos, siendo éstas más frecuentes en el codón 12 del gen c-K-*ras*. En los carcinomas la prevalencia de mutaciones era mayor que los tumores *borderline* y benignos, demostrando una relación entre mutaciones *ras* y estadios avanzados de la enfermedad, en especial en tumores no mucinosos (44, 45). Además, las frecuencias comparativas de las mutaciones c-K-*ras* en tumores mucinosos benignos, *borderline* y malignos sugieren que la activación mutacio-

Tabla 3. Mutaciones c-K-*ras* en tumores de ovario y apéndice cecal.

| Caso | Ovario    |          | Apéndice  |          |
|------|-----------|----------|-----------|----------|
|      | Codón 12  | Codón 13 | Codón 12  | Codón 13 |
| 1    | -         | -        | -         | -        |
| 2    | + (Asp) - | -        | + (Asp) - | -        |
| 3    | + (Asp) - | -        | + (Asp) - | -        |
| 4    | + (Asp) - | -        | + (Asp) - | -        |
| 5    | + (Asp) - | -        | + (Asp) - | -        |
| 6    | + (Val) - | -        | + (Val) - | -        |

+: tumor con mutación puntual; -: tumor sin mutación detectada; Asp: GGT→GAT (transición Gly→Asp); Val: GGT→GTT (transversión Gly→Val).

nal desempeña un papel en los estadios iniciales de la génesis de este tipo de tumores. La alta incidencia de mutaciones en el codón 12 del gen c-K-ras sugiere que esta alteración puede ser un evento importante en la carcinogénesis de los tumores mucinosos ya que ocurre en los estadios tempranos de la transformación neoplásica. De hecho, se han detectado mutaciones en el oncogén c-K-ras en diferentes entidades histológicas consideradas lesiones benignas o con supuesto potencial preneoplásico, como cistoadenomas y tumores *borderline* mucinosos.

Analizamos las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen c-K-ras en 95 tumores epiteliales ováricos mucinosos por PCR/RFLP (71). Su frecuencia fue del 66% (68% en el codón 12 y 11,5% en el codón 13; ocho tumores presentaron mutaciones en ambos codones). Estos resultados se correlacionaron con las características clínicas de las pacientes y patológicas de las neoplasias, y no observamos diferencias estadísticamente significativas entre mutaciones *ras*, el estadio del tumor y la supervivencia de las pacientes. Al dividir los tumores según el grado histológico, la frecuencia de mutaciones fue del 58% en los benignos, con un marcado incremento al aumentar el grado tumoral, siendo del 86% en los *borderline* y del 85% en los carcinomas. Realizamos un análisis comparativo de la presencia de mutaciones c-K-ras en diferentes áreas de distinto grado histológico observadas en un mismo tumor. Analizamos diez tumores *borderline* y cinco cistoadenocarcinomas que contenían áreas heterogéneas de menor grado. Los distintos componentes se obtuvieron mediante microdissección y se realizó el análisis de las mutaciones del gen c-K-ras de cada uno de ellos por separado. En 12 de los 15 casos analizados (80%) detectamos el mismo patrón mutacional en ambas áreas del mismo tumor. La caracterización de estas mutaciones demostró la misma mutación en ambos componentes [GGT>GAT (Gly>Asp) en 5 casos, GGT>GTT (Gly>Val) en cuatro y GGT>TGT (Gly>Cys) en tres]. Estos resultados confirmaron la presencia de mutaciones c-K-ras, no sólo en los componentes de bajo grado preexistentes sino también en las áreas adyacentes de alto grado. La frecuente heterogeneidad y la evidencia de que en algunos casos los componentes de bajo grado pueden preceder al desarrollo de tumo-

res más agresivos, junto con el hallazgo de la idéntica mutación en ambos elementos del mismo tumor, apoya la hipótesis de que las mutaciones c-K-ras son fenómenos iniciales en la génesis de los tumores mucinosos del ovario. Una explicación alternativa a la presencia de la misma mutación en áreas benignas, *borderline* y malignas del mismo tumor, es que las mutaciones c-K-ras estén relacionadas con la diferenciación mucinosa, que precede o es independiente de la transformación maligna. Sin embargo, se desconoce el momento exacto en que se incorpora la mutación.

Al dividir los tumores mucinosos en intestinales e intracervicales (müllerianos) observamos que la frecuencia de mutaciones c-K-ras era similar en ambos tipos tumorales (65% en los intestinales y 73% en los intracervicales). Aunque algunos autores sostienen que los tumores mucinosos de tipo intestinal e intracervical del ovario tienen orígenes histogenéticos distintos, la similar incidencia mutacional puede indicar que la activación del gen c-K-ras está más ligada a un fenotipo mucinoso que a un determinado origen histogenético. De hecho, estas mutaciones son muy frecuentes en la mayoría de tumores con diferenciación mucinosa del organismo, sin tener en cuenta su histogénesis (19, 20, 45).

Estos resultados confirman el hecho de que las mutaciones c-K-ras son frecuentes en tumores mucinosos ováricos benignos y especialmente en los malignos, además de apoyar la hipótesis de que la activación mutacional del protooncogén c-K-ras desempeña un papel importante en los estadios iniciales de la génesis de los tumores mucinosos.

### Tumores no mucinosos

El grupo de tumores no mucinosos (65) incluía 144 pacientes (35 con tumores benignos, 12 con tumores *borderline* y 97 con carcinomas). Había cinco tumores de Brenner benignos, tres de células mucoscretoras. En los tres tumores de Brenner con diferenciación mucinosa detectamos mutaciones en el codón 12 del gen c-K-ras. La incidencia de mutaciones observada en los tumores no mucinosos fue del 30,5%. Esta frecuencia fue menor en los tumores benignos (20%), con un ligero incremento (25%)

en los tumores *borderline*, que alcanzó el 35% en los carcinomas. Estas diferencias no tuvieron significación estadística (test de  $\chi^2=2,94$ ;  $p=0.23$ ), aunque existía una ligera tendencia al aumento en las formas tumorales más agresivas. La frecuencia de mutaciones *c-K-ras* fue inferior en los tumores benignos que en los *borderline* y malignos agrupados (test de  $\chi^2$  con corrección de continuidad,  $p=0.0011$ ). Al comparar la incidencia de mutaciones entre los distintos tipos histológicos de carcinomas no mucinosos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, con frecuencias similares que oscilaban entre el 20% y el 39,4% según el tipo histológico. El análisis de las curvas de supervivencia de las pacientes en función de la presencia o ausencia de mutaciones *c-K-ras* no reveló diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de las mismas, por lo que no se les podía atribuir un mejor o peor pronóstico en función de esta mutación.

El estudio desglosado del análisis de la frecuencia de mutaciones en los tumores ováricos mucinosos y no mucinosos reveló que las mutaciones *c-K-ras* eran más frecuentes en los tumores mucinosos que en los no mucinosos. Estas diferencias eran estadísticamente significativas (test de  $\chi^2$   $p\leq 0.000005$ ), independientemente del grado de agresividad biológica (Fig. 5). La baja frecuencia de mutaciones *c-K-ras* en los tumores no mucinosos benignos del ovario se hizo más evidente al excluir los tumores de Brenner, quedando reducida del 20% al 13%. Además, es interesante resaltar que los tumores de Brenner presentaron una alta incidencia mutacional (60%), casi comparable con la observada en nues-

tra serie de tumores mucinosos (68%). Este hallazgo, junto con la presencia de diferenciación mucinosa que presentan algunos tumores de Brenner, apoya la hipótesis de que la activación mutacional del protooncogén *c-K-ras* es una alteración genética importante en la patogénesis de los tumores epiteliales mucinosos y que está relacionada de alguna manera con el fenotipo mucinoso. Finalmente, la ausencia de una correlación estadísticamente significativa entre las mutaciones *c-K-ras* con ninguna de las características clinicopatológicas de los tumores no mucinosos, nos induce a concluir que las mutaciones *c-K-ras* no son una alteración genética que permita distinguir subgrupos tumorales con distinto comportamiento biológico. Las frecuencias en los tumores no mucinosos ováricos sugieren que en este grupo de neoplasias las mutaciones *c-K-ras* son alteraciones genéticas relacionadas con la progresión tumoral, al ser más frecuentes en los tumores malignos que en los benignos y *borderline*. Únicamente podemos concluir que las mutaciones del gen *c-K-ras* están presentes en los tumores epiteliales ováricos, sin que ello tenga implicaciones clínicoterapéuticas ni valor pronóstico añadido.

## CONCLUSIONES

- La detección de las mutaciones puntuales en los genes *ras* es de gran utilidad en el diagnóstico de pacientes con tumores sincrónicos.
- Las mutaciones del gen *c-K-ras* no tienen valor pronóstico en los tumores epiteliales del ovario.

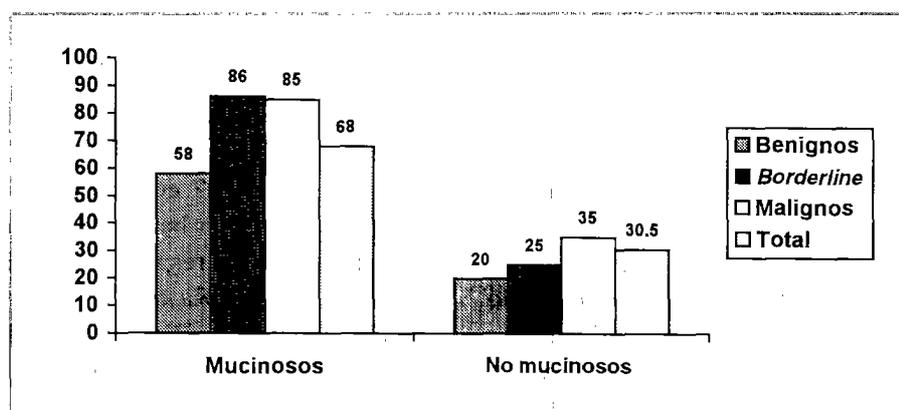


Figura 5. Frecuencia de mutaciones del gen *c-K-ras* en tumores epiteliales ováricos.

La incidencia de estas mutaciones no se correlaciona con ningún parámetro clínico ni con la supervivencia de las pacientes. Tampoco tienen relación con ningún rasgo histológico ni con el grado o estadio del tumor.

- Las mutaciones *ras* son uno de los pasos interactivos de la progresión del fenotipo normal a tumoral en los tumores epiteliales del ovario.
- Las mutaciones *ras* están presentes en las fases iniciales del proceso de transformación neoplásica en tumores mucinosos.
- Estas mutaciones son un indicador indirecto del acúmulo de alteraciones genéticas en la progresión tumoral, al ser una alteración molecular más en el proceso de progresión tumoral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. *Cancer statistics 1994*. CA 1994; 44: 7-26.
2. Gallion HH, Pieretti M, De Priest PD, van Nagell JR. *The molecular basis of ovarian cancer*. Cancer 1995; 76: 1992-1997.
3. Powell DE, Puls L, van Nagell J. *Current concepts in epithelial ovarian tumors: Does benign to malignant transformation occur?* Hum Pathol 1992; 23: 846-847.
4. Plaxe SC, Deligdisch L, Dottino PR, Cohen CJ. *Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol 1990; 38: 367-372.
5. Steinback F. *Benign, borderline and malignant serous cystadenomas of the ovary*. Pathol Res Pract 1981; 172: 58-72.
6. Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodríguez GC, Whitaker BS, Bast RC. *Growth regulation and transformation of ovarian epithelium*. Cancer 1993; 71: 545-551.
7. Puls LE, Powell DE, De Priest PD y cols. *Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma*. Gynecol Oncol 1992; 47: 53-57.
8. Foster KA, Harrington P, Kerr J y cols. *Somatic and germline mutations of the BRCA-2 gene in sporadic ovarian cancer*. Cancer Res 1996; 56: 3622-3625.
9. Berchuck A. *Biomarkers in the ovary*. J Cell Biochem Suppl 1995; 23: 223-226.
10. Katabuchi H, van Rees B, Lambers AR y cols. *Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas*. Cancer Res 1995; 55: 5556-5560.
11. Cramer DW, Barbieri RL, Muto MG, Kelly A, Brucks JP, Harlow BL. *Characteristics of women with a family history of ovarian cancer: II. Follicular phase hormone levels*. Cancer 1994; 74: 1318-1322.
12. King BL, Carcangiu ML, Carter D y cols. *Microsatellite instability in ovarian neoplasms*. Br J Cancer 1995; 72: 376-382.
13. King LA, Okagaki T, Gallup DG, Twigg LB, Messing MJ, Carson LF. *Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p21-ras, c-erbB2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: Mitotic count and Ki-67 are indicators of poor prognosis*. Gynecol Oncol 1996; 61: 227-232.
14. Tangir J, Loughride NS, Berkowitz RS y cols. *Fragment microsatellite instability in epithelial borderline ovarian tumors*. Cancer Res 1996; 56: 2501-2505.
15. Buller RE, Anderson B, Connor JP, Robinson R. *Familial ovarian cancer*. Gynecol Oncol 1993; 51: 160-166.
16. Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, Shroyer KR. *Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats*. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 292-297.
17. Fujita M, Enomoto T, Haba T y cols. *Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors*. Int J Cancer 1997; 74: 148-155.
18. Shigemasa K, Hu C, West CM y cols. *p16 overexpression: A potential early indicator of transformation in ovarian carcinoma*. J Soc Gynecol Investig 1997; 4: 95-102.
19. Bos JL. *Ras oncogenes in human cancer: A review*. Cancer Res 1989; 49: 4682-4689.
20. Capella G, Cronauer-Mitra S, Peinado MG, Perucho M. *Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors*. Environ Health Perspect 1991; 93: 125-131.
21. Narod SA, Madlensky L, Bradley L y cols. *Hereditary and familial ovarian cancer in Southern Ontario*. Cancer 1994; 74: 2341-2346.
22. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. *Hereditary ovarian cancer: A clinicopathological study*. Int J Gynecol Pathol 1992; 11: 180-187.
23. Khosravi-Far R, Der CJ. *The ras signal transduction pathway*. Cancer and Metastasis Reviews 1994; 13: 67-89.
24. Egan SE, Weinberg RA. *The pathway to signal achievement*. Nature 1993; 365: 781-783.
25. Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T. *Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosin kinases*. Nature 1990; 343: 377-380.
26. Hall A. *A biochemical function for ras-At last*. Science 1994; 264: 1413-1414.
27. Boguski MS, McCormick F. *Proteins regulating Ras and its relatives*. Nature 1993; 643-653.
28. Bourne HR, Saunders DA, McCormick F. *The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanisms*. Nature 1990; 349: 117-126.
29. Feig L. *The many roads that lead to Ras*. Science 1993; 260: 767.
30. McCormick F. *How receptors turn Ras on*. Nature 1993; 363: 15.
31. Polakis P, McCormick F. *Interactions between p21<sup>ras</sup> proteins and their GTPase activating proteins*. Cancer Surv 1992; 12: 25.
32. Verheijen MH, Defize LH. *Parathyroid hormone activates mitogen-activated protein kinase via a cAMP-mediated pathway independent of Ras*. J Biol Chem 1997; 272: 3423-3429.
33. Mary J. *Two major signal pathways linked*. Science 1993; 262: 988-990.
34. Rodríguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R y cols. *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a direct target of Ras*. Nature 1994; 370: 527-532.

35. Mc Cormick F. *Ras oncogenes*. En: Winberg R (Ed.). *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 125-145.
36. Anderson MW y cols. *Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis*. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 13.
37. Vogelstein BB, Fearon ER, Hamilton SR y cols. *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
38. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K y cols. *Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation*. *Cancer Res* 1993; 53: 953-956.
39. Vogelstein BB. *A genetic model of colorectal carcinogenesis*. *Cell* 1990; 61: 759.
40. Tabata T, Fujimori T, Maeda S, Yanamoto M, Saitoh Y. *The role of ras mutation in pancreatic cancer, precancerous lesions, and chronic pancreatitis*. *Int J Pancreatol* 1994; 14: 237-244.
41. Kumar R, Sukumar S, Barbacid M. *Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia*. *Science (Washington DC)* 1990; 248: 1101-1104.
42. Erill N, Cuatrecasas M, Sancho FJ y cols. *K-ras and p53 mutations in hamster pancreatic ductal adenocarcinomas and cell lines*. *Am J Pathol* 1996; 149: 1333-1339.
43. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O, Rice JM. *K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract*. *Cancer Res* 1990; 50: 6139-6145.
44. Mok SCH, Bell DA, Knapp RC y cols. *Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy*. *Cancer Res* 1993; 53: 1489-1492.
45. Teneriello MG, Ebin M, Linnoila RI y cols. *p53 and K-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms*. *Cancer Res* 1993; 53: 3103-3108.
46. Ichikawa Y, Nishida M, Suzuki H y cols. *Mutation of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors*. *Cancer Res* 1994; 54: 33-35.
47. Pieretti M, Cavalieri C, Conway PS, Gallion HN, Powel DE, Turker MS. *Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors*. *Int J Cancer* 1995; 64: 434-440.
48. Kaern J, Trope CG, Abeler VM. *A retrospective study of 370 borderline tumors of the ovary treated at the Norwegian Radium Hospital from 1970 to 1982: A review of the clinicopathologic features and treatment modalities*. *Cancer* 1993; 71: 1810-1820.
49. Kahn MA, Demopoulos RI. *Mucinous ovarian tumors with pseudomyxoma peritonei: A clinicopathological study*. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 15-23.
50. Praison R, Hart W, Petras R. *Pseudomyxoma peritonei. A clinicopathologic study of 19 cases with emphasis on site of origin and nature of associated ovarian tumors*. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 591-603.
51. Ronnett BM, Kurman RJ, Zahn CM y cols. *Pseudomyxoma peritonei in women: A clinicopathologic analysis of 30 cases with emphasis on site of origin, prognosis and relationship to ovarian mucinous tumors of low malignant potential*. *Hum Pathol* 1995; 26: 509-524.
52. Seidman JD, Elsayed AM, Sobin LH, Tavassoli FA. *Association of mucinous tumors of the ovary and appendix: A clinicopathologic study of 25 cases*. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 22-34.
53. Smith J, Kemeny N, Caldwell C, Banner P, Sigurdson E, Huvos A. *Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience*. *Cancer* 1992; 70: 396-401.
54. Sumithran E, Susil BJ. *Concomitant mucinous tumors of appendix and ovary: Result of a neoplastic field change?* *Cancer* 1992; 70: 2980-2983.
55. Young RH, Gilks CB, Scully RE. *Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei: A clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix*. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 415-429.
56. Lósi L, Benhattar J, Costa J. *Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer*. *Eur J Cancer* 1992; 28: 11.150-11.220.
57. Terunuma H, Hayakashi T, Tsuneyoshi T, Fujita M, Kino I, Baba S. *Mutational heterogeneity among individual tumors in a case of multiple primary malignancy of the colon*. *Jpn J Clin Oncol* 1993; 23: 350-355.
58. Noumoff J, LiVolsi V, Mikuta J y cols. *An insight into the etiology of pseudomyxoma peritonei by chromosomal and immunohistochemical analysis*. *Gynecol Oncol* 1993; 29: 136 (Abstract).
59. Pilotti S, Manenti G, De Georgio L, Lilke F, Chiarle R, Pierotti MA. *Identification of the same HRAS1 mutation in a primary minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland and its bone metastasis developed 15 years later*. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 73-74.
60. Sugio K, Inoue T, Inoue K y cols. *Different site mutation of the K-ras gene in a patient with metachronous double lung cancers*. *Anticancer Res (Greece)* 1993; 13: 2469-2471.
61. Chuaqui RF, Zhuang Z, Emmert-Buck MR y cols. *Genetic analysis of synchronous mucinous tumors of the ovary and appendix*. *Hum Pathol* 1998; 27: 165-171.
62. Fujita M, Enomoto T, Wada H, Inoue M, Okidaira Y, Shroyer KR. *Application of clonal analysis. Differential diagnosis for synchronous primary ovarian and endometrial cancers and metastatic cancer*. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 350-359.
63. Young R, Hart W. *Metastases from carcinomas of the pancreas simulating primary mucinous tumors of the ovary. A report of seven cases*. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 748-756.
64. Lash R, Hart W. *Intestinal adenocarcinomas metastatic to the ovaries. A clinicopathologic evaluation of 22 cases*. *Am J Surg Pathol* 1987; 11: 114-121.
65. Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E y cols. *K-ras mutations in non-mucinous ovarian epithelial tumors: A molecular analysis and clinicopathological study of 144 patients*. *Cancer* 1998; 82: 1088-1095.
66. Cuatrecasas M, Matías-Guiu X, Prat J. *Synchronous mucinous tumors of the appendix and the ovary associated with pseudomyxoma peritonei: A clinicopathologic study of six cases with comparative analysis of c-Ki-ras mutations*. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 739-746.
67. Pieretti M, Powell DE, Gallion HH, Case EA, Conway PS, Turker MS. *Genetic alterations on chromosome 17 distinguish different types of epithelial ovarian tumors*. *Hum Pathol* 1995; 26: 393-397.

68. Berchuck A, Kohler MF, Bast RC. *Oncogenes in ovarian cancer*. Hemathol Oncol Clinics N Am 1992; 6: 813-825.
69. Fukumoto M, Estensen R, Sha I y cols. *Association of K-ras with amplified DNA sequences detected in human ovarian carcinomas by a modified in-gel renaturation assay*. Cancer Res 1989; 49: 1963-1967.
70. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M y cols. *K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary*. Am J Pathol 1991; 139: 777-785.
71. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matías-Guiu X, Prat J. *K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: A clinicopathologic and molecular study of 95 cases*. Cancer 1997; 79: 1581-1586.

