

45



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**"DETERMINACION DE LA EXPRESION GENETICA
EN CELULAS NORMALES Y DE TUMORES DE
MAMA"**

T E S I S

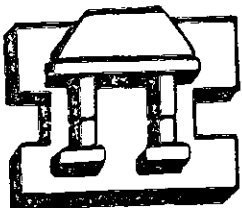
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

NORMAND GARCIA HERNANDEZ

DIRECTOR: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este escrito,

A todas las personas que están afectadas o han fallecido a consecuencia del cáncer, espero que mi labor contribuya modestamente con pistas para investigaciones que induzcan a mitigar el dolor y las letales consecuencias de este padecimiento, y que provean una mejor calidad y expectativa de vida.

A mí madre Irma Laura Josefina, que día a día se esfuerza por ser mejor, por brindarme su apoyo incondicional y descomunal amor. Que siempre me permite dar rienda suelta a todas aquellas ideas que asaltan mi mente, que avivan una insaciable sed de conocimiento y que me han llevado a un sin fin de osadas aventuras, tal como la ciencia.

A Carlos Ignacio, por su apoyo constante y amistad.

A mí hermano Donovan, al que sigo como ejemplo, por su madurez y destreza para tomar decisiones en los momentos pertinentes.

A mí hermana Wanda Esmeralda, que me sirve de parámetro entre el bien y el mal, si bien hay que tomarse la libertad de vivir de vez en cuando, la respeto porque ha sabido ganarse su lugar en la vida, y espero retribuirle su apoyo para que logre todo lo que se proponga.

A mí hermana Giselle, que ha mostrado gran fortaleza, y que día con día ve sus metas más cercanas.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda que me ha expresado su confianza y apoyo en todo momento, le agradezco su amistad, su paciencia y la oportunidad que me brinda de entrar a un mundo lleno de retos intelectuales apoyado de sus sabios consejos.

Agradecimientos

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez, por permitirme integrarme al grupo de investigación, por su apoyo y confianza.

A los sinodales, Dr. Sergio Vaca Pacheco, M. en C. Martha Salcedo Álvarez, Biol. Irma E. Dueñas García y el M. en C. Eduardo Barrera Escorcía, por el apoyo en la revisión de este trabajo.

A los profesores, M. en C. Mónica Gonzáles Isais, Dra. Leticia Moreno Fierros, Biol. Virginia Nonaka Navarro, Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz y el M. en C. Adán Valladares Salcedo, por su apoyo y consejos brindados durante la realización de mis estudios.

A mí familia que me apoya constantemente, en especial a mis tías Lilia, Magdalena y Gabriela.

Y a todos mis amigos y compañeros, que para no omitir a ninguno, no pondré nombres, espero que no se sientan ofendidos, les agradezco a todos y a cada uno de ustedes que de una u otra forma se han visto involucrados y han compartido mi formación y trayectoria académica, a los que me han motivado a seguir adelante o que simplemente están ahí en todo momento, en especial a aquellos de la FES Iztacala y el CMN, S-XXI, **G R A C I A S .**

Normand

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de proyecto 34451-M.

Índice

	Página
Resumen	3
1. Introducción.	4
1.1 Características del cáncer de mama.	5
¿Qué es el cáncer?	5
¿El cáncer de mama?	6
1.2 Detección.	7
1.3 Etapas del cáncer de mama.	7
1.4. Biología Molecular del cáncer de mama.	10
1.5 Justificación.	12
2. Objetivo general.	13
2.1 Objetivos particulares.	13
3. Métodos.	14
3.1 Estrategia metodológica.	14
3.2 Origen de la muestra.	15
3.3 Procedimiento de extracción de RNA total a partir de tejido normal o tumoral.	15
3.4 Tratamiento del RNA total con DNA'asa.	16
3.5 Obtención de RNA poli A.	17
3.6 Micro arreglos.	17
3.6.1 Marcaje de sondas de cDNA.	17
3.6.2 Purificación de las sondas.	17
3.6.3 Determinación de la incorporación de ³² P y actividad específica de las sondas marcadas.	18
3.6.4 Hibridación de las sondas de cDNA a la membrana.	18
3.6.5 Normalización de datos.	18
3.6.6 Análisis de la matriz de expresión.	19
3.6.7 Transformación de los datos para su interpretación gráfica.	19
3.6.8 Análisis por agrupamiento jerárquico de la matriz.	19
4. Resultados.	20
4.1 Características de los tumores.	20
4.2. Obtención de RNA total.	20
4.3 Obtención de la sonda a partir de RNA poli A de tumores mamarios.	20
4.4 Obtención y análisis de los patrones de expresión.	21
4.5 Comparación de los patrones de expresión entre muestras.	22
5. Discusión.	30
6. Anexo de abreviaturas	34
7. Bibliografía	37

Resumen

Las consecuencias letales de la proliferación celular anormal en humanos, motivan la investigación de las redes de regulación de expresión genética. Actualmente los estudios se enfocan hacia oncogenes y genes supresores, que regulan el desarrollo, diferenciación y división celular. Las técnicas modernas desarrolladas para detectar alteraciones moleculares permiten clarificar los mecanismos moleculares en la transformación neoplásica, que dados los múltiples factores de riesgo hacen muy heterogéneo el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Por lo que es necesario conocer las combinaciones específicas de genes que afectan el avance del cáncer. En este trabajo se determinaron los patrones de expresión en células de mama normal y tumores de mujeres mexicanas. Para lo cual se aisló el RNA poli-A de dos tumores mamarios. Mediante Micro-arreglos de cDNA, se comparó la expresión de cada tumor con RNA poli-A obtenido de tejido mamario no afectado. Se analizaron 597 genes relacionados a cáncer. Se encontró en los tumores un 8.5% de genes sobre expresados y un 22.7% de los genes bajo expresados mediante la evaluación de su expresión. El estudio aporta datos para identificar alteraciones genéticas involucradas en el proceso neoplásico. Por otro lado, contribuye al conocimiento básico de éste y dada la heterogeneidad descrita, permite perfilar genes que puedan servir como marcadores de diagnóstico, blancos de interés terapéutico e indicadores de pronóstico.

1. Introducción.

Es ampliamente conocido que en los organismos miles de genes y sus productos funcionan en una complicada y orquestada red para crear la vida; la naturaleza y extensión de las interacciones moleculares de genes y productos de éstos motivan una de las más fundamentales cuestiones de la Biología. Las interacciones genéticas son centrales para entender la función y estructura molecular, el metabolismo celular, el desarrollo de células y tejidos, la respuesta del organismo a su medio y una base fundamental para explicar su adaptación y evolución.

En las últimas dos décadas se ha mostrado un enorme avance en nuestro entendimiento del cáncer a nivel molecular, el cual ha revelado un gran número de nuevos blancos para el desarrollo de terapias efectivas, ya que muchos de ellos identifican eventos tempranos y tardíos en el proceso de carcinogénesis. El adulto humano se compone de aproximadamente 10^{15} células, las cuales son requeridas para formar tejidos y órganos. Un claro ejemplo son las células en la capa basal de la piel que se dividen, diferencian y finalmente mueren desprendiéndose del epitelio. Las células que conforman la capa epitelial de intestinos son producidas y remplazadas cada 10 días aproximadamente, hay células que su vida va desde 24 horas a decenas de días. Por otro lado las células progenitoras o "Stem" tienen una alta capacidad de división celular de aproximadamente 10^{12} divisiones por día. Aún en órganos en los cuales normalmente se exhiben niveles bajos de división, por ejemplo el hígado, la proliferación masiva puede ser iniciada por eventos tales como un trauma o una infección [Bertram J S, 2001].

A pesar de esta enorme producción celular, el cuerpo humano mantiene un peso constante por muchas décadas. Este exquisito control sobre la multiplicación es conseguido por una red de mecanismos moleculares superpuestos que gobiernan la proliferación celular y la muerte celular programada (apoptosis). Cualquier factor que altere este balance tiene el potencial, si no es corregido, de alterar el número total de células en un órgano o tejido particular. Después de muchas generaciones de células, éste incremento podría ser clínicamente detectable como neoplasia, literalmente un nuevo crecimiento [Bertram J S, 2001].

Estamos en una era de descubrimientos en investigación biomédica paralela sólo con el periodo de avances hechos en física a principios del siglo pasado que dejó ver los misterios del átomo. Descubrimientos en biología estructural y molecular, junto con el rápido desciframiento de los genes de organismos patológicos y virus, para genomas procariontes, eucariontes y el mismo genoma humano, han revolucionando la medicina. Se han dilucidado mecanismos moleculares críticos e importantes en el desarrollo y división celular, regulación del desarrollo embrionario y causas de enfermedades. Estos descubrimientos en conjunto con nuevas tecnologías irrumpen en el diagnóstico genético y permiten nuevas estrategias de investigación en la lucha contra diversas enfermedades, como el cáncer.

El entendimiento decisivo para deducir la neoplasia fue hecho en sistemas de tumores animales. Comenzando con el descubrimiento del virus sarcoma por Rous en 1911, [Rous P, 1911 en DeVita T *et al*, 1997;] y continuó con la identificación de genes transformantes

contenidos en retrovirus, [DeVita T *et al*, 1997; Bishop J, 1983]. El trabajo de carcinogénesis en pollos, ratones, ratas y gatos ha dominado la escena de investigación.

Hace unos veinticinco años, la investigación del cáncer cambio dramáticamente de cancerígenos y mutágenos hacia oncogenes y genes supresores de tumor, que ahora se sabe regulan la división celular, diferenciación y desarrollo, con el subsecuente reconocimiento de que el cáncer es principalmente una enfermedad genética [DeVita T *et al*, 1997].

Los oncólogos se enfrentan diariamente con las letales consecuencias de la proliferación celular anormal. Armados con lo mejor de farmacología y radiología, tratan de restaurar la salud. Formas avanzadas de tratamiento requieren la clarificación de mecanismos moleculares de la transformación neoplásica, proliferación y el entendimiento de la oncogénesis molecular [DeVita T *et al*, 1997].

1.1 Características del cáncer de mama.

¿Qué es el cáncer?

El cáncer es un proceso de múltiples pasos que conducen a la alteración de la regulación del crecimiento celular. En el proceso neoplásico deben ocurrir múltiples alteraciones genéticas, usualmente a lo largo de los años. Aún cuando estas alteraciones están presentes en la línea germinal, como ocurre en los síndromes de predisposición a cáncer, la mayoría de éstas se adquieren en forma de mutaciones somáticas: translocaciones cromosomales, deleciones, inversiones, amplificaciones, mutaciones puntuales y factores epigenéticos. Las mutaciones ocasionan ganancia de función que activan oncogenes, los cuales son efectores positivos de transformación o bien inactivan genes supresores de tumor que son reguladores negativos de crecimiento y la pérdida de su función promueve la carcinogénesis [DeVita T *et al*, 1997].

El crecimiento de tejido nuevo es resultado de una continua y rápida proliferación de células anormales que invaden y destruyen otros tejidos, puede surgir en cualquier tipo de célula o tejido corporal e incluye un número de enfermedades clasificadas de acuerdo al tipo de tejido y células en las cuales ocurre. Hay tres principales subtipos:

Sarcomas: Crecen a partir de tejido conectivo y de soporte como los huesos, cartílago, nervio, músculo y grasa.

Leucemias y linfomas: Incluyen el cáncer que implica tejidos de formación.

Carcinomas: Incluyen las formas más frecuentes de cáncer humano, se originan de tejido epitelial como la piel, la cubierta de cavidades y órganos del cuerpo y de tejido glandular como el de mama y próstata. Los carcinomas con una estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Aquellas que parecen tejido glandular se llaman adenocarcinomas [DeVita T *et al*, 1997].

Las células de una neoplasia son clonales y son telomerasa positivas, lo que les permite dividirse continuamente, por otro lado son incapaces de diferenciarse o madurar, conforme se multiplican pueden formar una masa denominada tumor, que crece sin considerar la función del tejido del que se originó [Yokota J, 2000].

¿El cáncer de mama?

Cada mama tiene entre 15 y 20 secciones llamadas lóbulos, los cuales a su vez se dividen en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lóbulos y lobulillos se conectan por tubos delgados denominados conductos. El cáncer intraductal, el tipo de cáncer mamario más común, se encuentra en las células de los conductos. El cáncer que se origina en los lóbulos o lobulillos se llama cáncer lobular, éste es el que más frecuentemente afecta a las dos mamas. El cáncer inflamatorio de mama es poco común y se caracteriza por que la mama se observa cálida, enrojecida e hinchada.

Entre los factores de riesgo identificados para el desarrollo de esta neoplasia, la mujer cuya familia tiene antecedentes de cáncer de mama tiene mayor riesgo de padecer la enfermedad. Se estima que del 15 al 20% del total de mujeres con este desorden tienen historia familiar de la enfermedad. De los casos hereditarios de un 25 a 50% son atribuidos a la susceptibilidad de alelos dominantes, se han descrito al menos dos genes de riesgo BRCA1 y BRCA2 [Vogelstein B *et al*, 1998].

El riesgo estimado de desarrollar cáncer de mama en las mujeres con mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 es del 40% al 85%, además tienden a desarrollar la enfermedad en ambas mamas, cáncer ovárico y otras neoplasias primarias [Frank T S *et al*, 1998; The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Ford D, 1994]. El hombre portador para mutaciones en BRCA2 también corre mayor riesgo de tener cáncer de mama [The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999].

BRCA1 es un gen de susceptibilidad a cáncer de mama altamente penetrante localizado en el cromosoma 17q21 [Hall J M *et al*, 1990], está asociado a un 40-50% de cáncer heredado [Ford D *et al*, 1994]. Las familias con mutación en la línea germinal de BRCA1 tienen un patrón de herencia dominante autosómico de cáncer de mama así como un incremento en la incidencia de cáncer de ovario [Miki Y *et al*, 1994; Berry D A *et al*, 1997]. El espectro de mutaciones en BRCA1 está bien definido [Vogelstein B *et al*, 1998; Frank T S *et al*, 1998].

BRCA2 es un gen de susceptibilidad de cáncer de mama altamente penetrante ubicado en el cromosoma 13q12-13, asociado a un 30-40% de cáncer hereditario. Las familias con mutación de BRCA2 en la línea germinal tienen un patrón de herencia dominante autosómico de cáncer de mama y una alta incidencia de cáncer de ovario. El espectro de mutaciones en este gen no está bien definido. El hombre portador de mutaciones en este gen también corre mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama [Vogelstein B *et al*, 1998].

Análisis funcionales de los productos de BRCA1 y BRCA2 han establecido su participación dual en la regulación de la transcripción y reparación de daño del DNA. La base molecular de las funciones de BRCA1 y BRCA2 ha sido proporcionada por estudios que implican a estos dos supresores de tumor, en el mantenimiento de la estabilidad genética y la regulación del crecimiento de la célula y su diferenciación [Zheng L *et al*, 2000].

Con lo que respecta a la forma esporádica, la más común, se han descrito otros factores de riesgo, uno digno de consideración son los anticonceptivos hormonales. Algunas investigaciones sugieren que hay una conexión entre el uso de los anticonceptivos y un ligero aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama [Leena H-C, 2000]. Otras causas

asociadas a esta neoplasia son mutaciones en el gen p53, nuliparidad, menarquía prematura, edad avanzada y antecedentes personales de cáncer de mama [National Cancer Institute, 2001].

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17p13.1. Codifica para una fosfoproteína nuclear con propiedades inhibitorias de crecimiento celular. El gen se activa en células que sufrieron daño en su genoma y su producto interactúa con el DNA de una manera secuencia específica, regulando la expresión de genes blanco. La activación en respuesta a irradiación o agentes genotóxicos resulta en arresto en la fase G1 del ciclo celular lo que permite activar los sistemas de reparación del DNA o bien la apoptosis. Un gen regulado por p53 es el gen BAX, un homólogo de BCL-2, que inicia la apoptosis. También baja la expresión del gen de la ciclina A, ocasionando un segundo freno en la fase S del ciclo celular. La fosforilación de la proteína p53 controla la unión específica de ésta con sus diversos genes blanco. Se estima que del 50-70% de las neoplasias tienen inactivado el gen p53. La inactivación se da por diversos mecanismos como eliminaciones y mutaciones puntuales. La pérdida de función ocasiona un inapropiado crecimiento celular, incrementa la supervivencia de la célula y la inestabilidad genética [Medline].

Los cambios moleculares asociados al cáncer de mama esporádico han sido estudiados ampliamente. Factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de señalización intracelular, reguladores de ciclo celular, moléculas de adhesión, y proteasas han mostrado estar alterados en cáncer de mama esporádico [Vogelstein B *et al*, 1998].

1.2 Detección.

El cáncer de mama es heterogéneo en su descripción clínica y genética [Bertucci F *et al*, 2000; Vogelstein B *et al*, 1998]. El diagnóstico de esta neoplasia es mediante la presencia de una masa tumoral en la mama, detectada por tacto o por mamografías. Aproximadamente el 30% de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama están en un desarrollo metastásico de la enfermedad, que resulta fatal [Vogelstein B *et al*, 1998].

Otra forma de diagnóstico es mediante el análisis de receptores de estrógeno y progesterona y pueden proporcionar mayor información sobre la probabilidad de que el tumor recurra [Fisher B *et al*, 1986].

1.3 Etapas del cáncer de mama.

Una vez detectado el cáncer de mama, se harán más análisis para determinar si el cáncer se ha diseminado de la mama a otras partes del cuerpo. El cáncer de mama se clasifica en cuatro etapas con base al tamaño del tumor y si es o no invasivo. Las etapas son:

Etapa 0

Alrededor del 15%-20% de las neoplasias mamarias son tempranas, también llamadas carcinomas *in situ*. Existen 2 tipos de cáncer de mama *in situ*, el carcinoma intraductal y el carcinoma lobular. Este último no es un cáncer, pero para fines de clasificación se le llama carcinoma *in situ* o cáncer de mama etapa 0. Las pacientes con esta condición tienen una probabilidad del 25% de desarrollar cáncer de mama en cualquiera de las mamas en los próximos 25 años.

Etapa I

El cáncer no mide más de 2 centímetros y no se ha extendido fuera de la mama.

Etapa II

Se divide en etapa IIA y IIB.

La etapa IIA se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

- El cáncer no mide más de 2 centímetros pero se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo del brazo (los ganglios linfáticos axilares)
- El cáncer mide entre 2-5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

La etapa IIB se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

- El cáncer mide entre 2-5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.
- El cáncer mide más de 5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

Etapa III

Se divide en etapa IIIA y IIIB.

La etapa IIIA se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

- El cáncer mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y estos están unidos entre sí o a otras estructuras.
- El cáncer mide más de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

La etapa IIIB se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

- El cáncer se ha diseminado a tejidos cerca de la mama (la piel o la pared torácica, incluyendo las costillas y los músculos del tórax)
- El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.

Etapa IV

- El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia a los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro; o el tumor se ha diseminado localmente a la piel y a los ganglios linfáticos dentro del cuello, cerca de la clavícula [National Cancer Institute, 2001].

Se han descrito otros tipos de neoplasias mamarias como el cáncer inflamatorio de mama, este es poco común y se caracteriza porque la mama da la impresión de estar inflamada, tiene una apariencia rojiza y una temperatura tibia. La piel puede tener signos de surcos, ronchas o huecos en general. El cáncer inflamatorio de mama tiende a diseminarse rápidamente.

El cáncer de mama puede ser una enfermedad multicéntrica y bilateral, siendo esto más común en pacientes con carcinoma lobular infiltrante [Orel S G *et al*, 1992]. El riesgo de desarrollar un cáncer primario en la mama contralateral es alto [Rosen P P *et al*, 1993; Gustafsson A *et al*, 1994] y la edad de una paciente menor de 55 años parecen aumentar este riesgo [Broet P *et al*, 1995]. Por otro lado el desarrollo de un cáncer de mama contralateral está asociado con un mayor riesgo de recurrencia distante [Healey E A *et al*, 1993].

La probabilidad de recuperación y selección de tratamiento dependerá de diversas características propias del cáncer y de la mujer afectada, por ejemplo la etapa en la que se encuentra la neoplasia, la edad, el peso o si tiene o no período menstrual la mujer. Por otro lado los altos niveles de estrógenos tienen un papel dual en el desarrollo de esta neoplasia. También se ha reportado que las mujeres con osteoporosis tienen menor posibilidad de desarrollar cáncer. [Leena H-C, 2000].

La mayoría de personas con cáncer de mama se someten a una cirugía con el fin de extraer el tumor. Generalmente, también se extraen algunos ganglios linfáticos axilares, con el fin de detectar la presencia de células cancerosas. Además de la cirugía, se emplean otros 3 tratamientos para corregir esta enfermedad. La radioterapia, la quimioterapia y la terapia hormonal. Los cuatro tratamientos suelen combinarse.

La terapia de reemplazo hormonal (HRT por sus siglas en inglés) generalmente no se usa en mujeres con cáncer de mama, porque está probado que el estrógeno es un factor de crecimiento para la mayoría de células neoplásicas en el laboratorio. La HRT presenta un dilema para las supervivientes, muchas de las cuales entran en menopausia prematuramente como resultado de la terapia. Si bien, ni el embarazo, ni el uso de píldoras anticonceptivas después del diagnóstico de cáncer de mama han afectado en forma adversa la supervivencia de las mujeres [Collaborative Group on H F in B C, 1996].

Recientemente se está evaluando la terapia biológica en ensayos clínicos. En esta alternativa terapéutica se hace uso del sistema inmunitario de la paciente para combatir el cáncer, utilizando el trasplante de médula ósea y el trasplante de células madres periféricas sanguíneas.

1.4. Biología molecular del cáncer de mama.

En mujeres con cáncer de mama con características histológicas y físicas similares se ha encontrado una heterogeneidad en el ámbito molecular, lo que ocasiona respuestas antagónicas a un mismo tratamiento. Por lo que es necesario realizar estudios a nivel transcripcional, para distinguir subgrupos que respondan más acertadamente al pronóstico médico [Bertucci *et al*, 2000].

Se han identificados diversas mutaciones genéticas asociadas a esta neoplasia, sin embargo las combinaciones específicas de mutaciones requeridas para inducir el cáncer de mama siguen siendo desconocidas. Un acercamiento para identificar las alteraciones genéticas requeridas para el inicio, progresión y metástasis de este proceso implica establecer un sistema experimental que contribuya al esclarecimiento de esta enfermedad. [Elenbaas B *et al*, 2001].

La amplia información generada por el Proyecto Genoma Humano permite la identificación de genes o fragmentos de genes a través de la secuenciación masiva de clones cDNA o regiones genómicas. La habilidad de relacionar genes que estén implicados en una variedad de procesos normales o de enfermedad, puede conducir al descubrimiento de genes que puedan servir como marcadores de diagnóstico, indicadores pronóstico o blancos de interés terapéutico.

Los métodos tradicionales de la Biología Molecular trabajan “básicamente sobre un gen en un experimento”, esto es limitado ya que las interacciones de éste con otros no se pueden conocer. Por lo que es necesario un análisis sistemático de los patrones de expresión que permitan revelar funciones y rutas de genes.

Una nueva tecnología, denominada Micro arreglos (“Micro Array”), ha atraído interés entre los biólogos, ya que es una herramienta para cuantificar niveles de expresión genética; esta tecnología permite el estudio simultáneo de decenas a miles de genes, lo que provee pistas para la comprensión del cáncer. Los Micro arreglos DNA son superficies sólidas, con matrices de DNA representando genes en posiciones específicas. Los micro arreglos DNA se emplean para identificar genes que están encendidos o apagados en una célula o tejido. También se utilizan para evaluar la expresión de genes bajo ciertas condiciones. Están contruidos basándose en cDNA's, secuencias u oligonucleótidos enlazados covalentemente a superficies de vidrio o nylon (“Chips de DNA”). Las manchas de DNA son de 200 micras o menos de tamaño. Una laminilla típica contiene miles de genes (fase inmóvil). En los Micro arreglos una preparación de cDNA marcado por fluorescencia o radioactividad (“fase móvil”) obtenida a partir de RNA total o RNA poliA de un tipo celular o tejido específico, se hibrida con la fase inmóvil. La intensidad de las manchas de hibridación refleja y permite la valoración de la abundancia relativa de los genes expresados.

Existen diversos sistemas comerciales para análisis de Micro arreglos, nosotros empleamos el sistema de la casa comercial Clontech. En este existen 609 fragmentos por duplicado de diversos genes, 588 están relacionados con el cáncer, 12 son controles negativos y 9 controles positivos “house keeping”, (Figura 1).

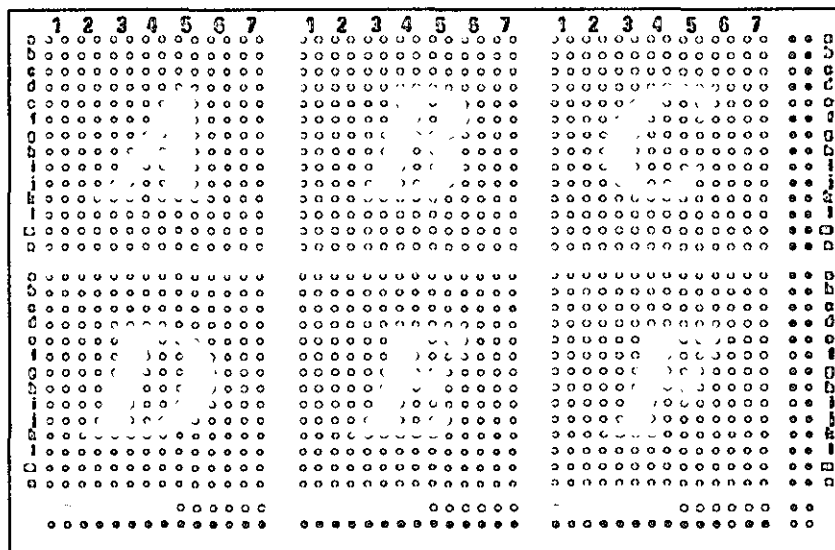


Figura 1.- Imagen de la membrana de Micro arreglo. Se muestra un mapa de la posición de cada gen en la membrana que contiene 609 genes representados por un par de manchas. A.-Reguladores de ciclo celular y de crecimiento; B.- Apoptosis; oncogenes; supresores de tumor; C.- Respuesta a daño celular, reparación y recombinación, Receptores para el desarrollo y destino celular; D.- Adhesión celular, motilidad y angiogénesis; E.- Reguladores de invasión; interacciones célula-célula; F.- Factores de crecimiento; Citosinas; G.- Genes de la economía doméstica ("House keeping genes"), Controles negativos.

1.5 Justificación.

En el mundo el cáncer es la segunda causa de decesos, en nuestro país el cáncer de mama ocupa el segundo lugar en mortalidad en mujeres, después del cáncer cérvico uterino. La dificultad para tratar esta neoplasia debido a la gran heterogeneidad histológica y clínica que presenta, complica su estudio, esto motiva el estudio de las redes de regulación genética en mujeres que padecen esta neoplasia. Por lo que la caracterización molecular a gran escala del cáncer de mama (CM) contribuirá al conocimiento básico de este padecimiento y a la posibilidad de un mejor pronóstico y tratamiento.

2. Objetivo general.

- **Determinar la expresión genética de células de mama normales y tumorales.**

2.1 Objetivos particulares.

- **Obtención del RNA total a partir de tejido normal y tumoral, de mujeres mexicanas.**
- **Aislamiento de RNA poli A y obtención cDNA mediante RT-PCR.**
- **Estandarización de la técnica de Micro arreglos.**
- **Determinar los patrones de expresión en células mamarias normales y tumorales mediante Micro arreglos de cDNA**

3. Métodos.

3.1 Estrategia metodológica.

La figura 2 muestra la estrategia empleada en este trabajo.

ESTRATEGIA METODOLOGICA.

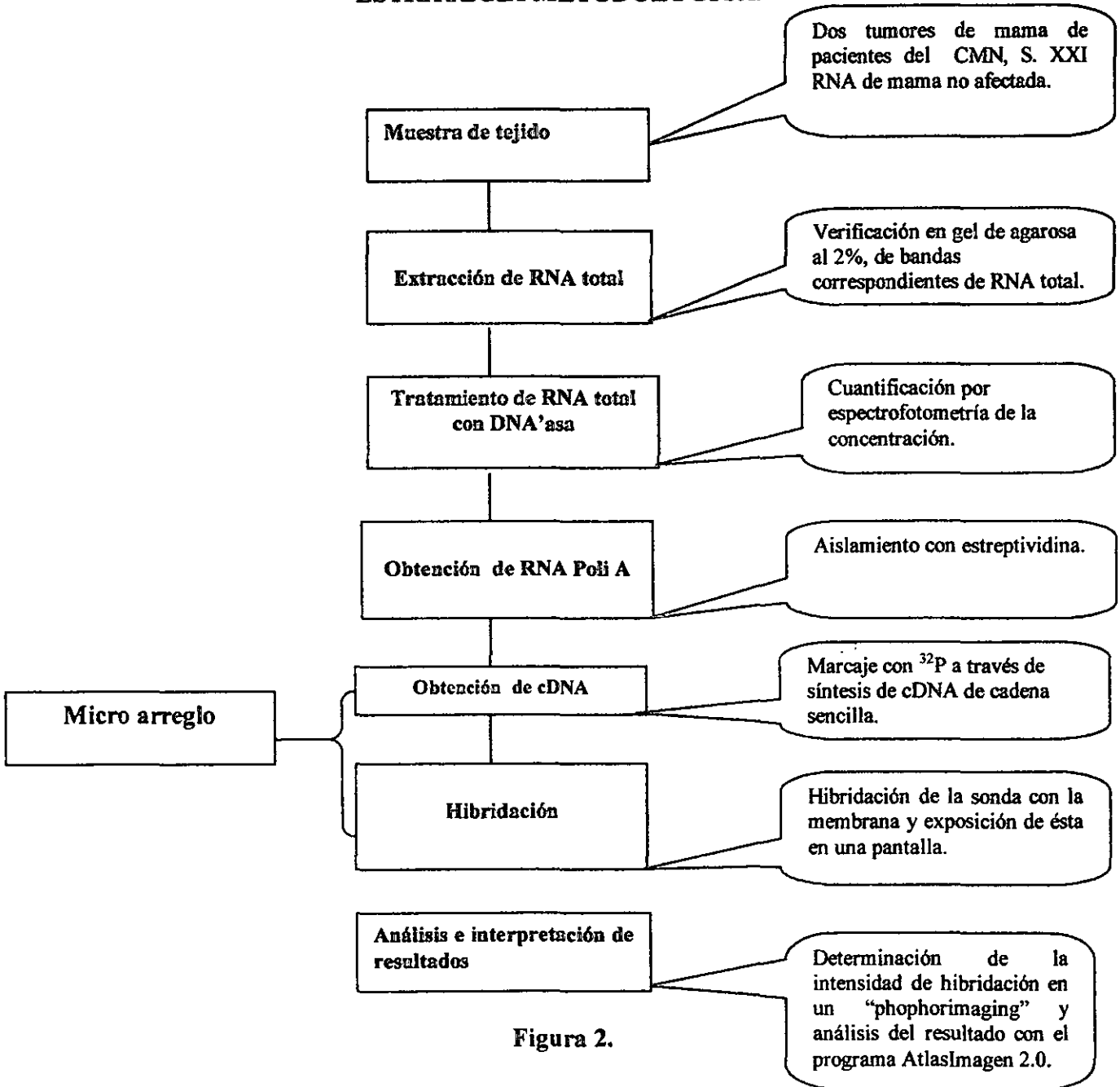


Figura 2.

3.2 Origen de la muestra.

Se analizaron dos tumores mamarios de pacientes mexicanas captados en la consulta externa del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante el primer semestre del año 2001. Se definió la etapa por medio de exámenes histopatológicos de las biopsias, utilizando los criterios del Comité Americano de Cáncer [Cotran R S *et al*, 1994]. Como control se utilizó RNA poli A de glándula mamaria sin neoplasia (Clontech).

3.3 Procedimiento de extracción de RNA total a partir de tejido normal o tumoral.

Para la extracción de RNA se utilizó el paquete comercial Atlas pure Total, Clontech. Todo el material de cristalería fue horneado a 300° C por 4 hrs. y el material plástico empleado fue nuevo libre de RNA'asas o tratado con cloroformo. El tumor fue pesado en un tubo previamente enfriado. Se cortó y fraccionó en pequeñas piezas, sobre un mortero en presencia de nitrógeno líquido, ya que aún el descongelamiento parcial puede resultar en degradación del RNA. Se homogeneizó la muestra a 0-4° C en presencia de solución desnaturante (sol. comercial) utilizando un homogenizador de tejidos (PRO Scientific Inc), para liberar el RNA total (Ver tabla 1 para determinar el volumen apropiado de la solución desnaturante). La homogenización se realizó en tubos cónicos de 50 ml, libres de RNA'asas. El homogenizado se centrifugó a 12 krpm durante 5 minutos a 4° C, se incubó en hielo 10 minutos, posteriormente se agitó fuertemente utilizando vortex y se centrifugó nuevamente utilizando las condiciones anteriores. Al sobrenadante obtenido se le hicieron dos extracciones con fenol-cloroformo de acuerdo a lo siguiente. Se agregó un volumen de fenol saturado (ver tabla 1 para determinar el volumen apropiado del fenol) al tubo con el sobrenadante. El tubo se agitó con vortex 1 minuto y posteriormente se incubó 5 minutos en hielo. Se agregó cloroformo (ver tabla 1 para determinar el volumen apropiado de cloroformo), se agitó 2 minutos con vortex, se incubó sobre hielo 5 minutos y se centrifugó a 12 krpm durante 10 minutos a 4° C. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo y el RNA se precipitó agregando lentamente un volumen de isopropanol (ver tabla 1 para determinar el volumen apropiado de isopropanol) mezclando e incubando sobre hielo 10 minutos. Se centrifugó el precipitado a 12 krpm por 15 minutos a 4° C. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 80% (ver tabla 1 para determinar el volumen apropiado del etanol), centrifugando a 12 krpm por 5 min. a 4° C, se secó al aire y se resuspendió en suficiente H₂O libre de RNA'asas, para asegurar una concentración de 1µg/µl (ver tabla 2). Las muestras de RNA se almacenaron a -70° C, hasta su uso.

Peso del tejido	10-100 mg	100-300 mg	300-600 mg	0.6 - 1.0 mg
Tamaño del tubo	2 x 2 ml	15 ml	50 ml	50 ml
Sol. Desnaturante	1.0 ml	3.0 ml	6.0 ml	10.0 ml
Fenol saturado	2.0 ml	6.0 ml	12.0 ml	20.0 ml
Cloroformo	0.6 ml	1.8 ml	3.6 ml	6.0 ml
Fenol saturado 2°	1.6 ml	4.8 ml	9.6 ml	16.0 ml
Cloroformo 2°	0.6 ml	1.8 ml	3.6 ml	6.0 ml
Isopropanol	2.0 ml	6.0 ml	12.0 ml	20.0 ml
EtOH 80 %	1.0 ml	3.0 ml	6.0 ml	10.0 ml

Tomada del manual Atlas pure Total, Clontech (2000).

Tabla 2. - Rendimiento de RNA total antes y después del tratamiento con DNA'asa.

Tejido	Monto de material inicial	RNA total	Después de DNA'asa
Hígado de rata	100 mg	600 µg	420 µg
Músculo esquelético	100 mg	90 µg	60 µg
Cerebro de ratón	100 mg	125 µg	90 µg
Bazo de ratón	100 mg	245 µg	170 µg
Testículo de ratón	100 mg	240 µg	170 µg
Timo de ratón	100 mg	85 µg	60 µg
Cerebelo de humano	100 mg	85 µg	60 µg
Tumor de próstata de humano	100 mg	100 µg	70 µg
Línea celular MCF-7	1 x 10 ⁷ células	70 µg	50 µg
Fibroblastos de ratón	1 x 10 ⁷ células	800 µg	560 µg
Línea celular U251	1 x 10 ⁷ células	95 µg	60 µg

Tomada del manual Atlas pure Total, Clontech (2000).

3.4 Tratamiento del RNA total con DNA'asa.

El tratamiento con DNA'asa se realizó con el paquete comercial Atlas pure Total, Clontech. Cada muestra de RNA fue tratada con DNA'asa I con base a la siguiente reacción. En un tubo de 1.5 ml se mezclaron los siguientes reactivos.

- 500 µl RNA total (1mg/µl)
- 100 µl Buffer DNA'asa I 10X (sol. comercial)
- 50 µl DNA'asa I (1 unidad/ µl)
- 350 µl H₂O desionizada
- 1.0 ml Volumen total

La solución se mezcló con pipeta y se incubó a 37° C por 30 min. Se agregaron 100 µl de mezcla de terminación 10X (sol. comercial). La reacción se dividió en dos tubos y se les realizó una extracción con fenol-cloroformo (500 µl de fenol saturado y 300 µl de cloroformo). La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos y se les agregó 550 µl de cloroformo. La mezcla se agitó con vortex y centrifugó a 14 krpm por 10 min. a 4° C. La capa superior se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con 50 µl de acetato de sodio 2M y 1.5ml de etanol. El tubo se incubó en hielo por 10 min. y se centrifugó a 14 krpm por 15 min. a 4° C. La pastilla resultante se lavó con 500 µl etanol al 80%. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Posteriormente se disolvió en H₂O libre de RNA'asas y se almacenó a -70° C, hasta su uso. La concentración y pureza del RNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa y por espectrofotometría, como se describe a continuación. Una alícuota de RNA (1-3 µl) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, durante 2 hrs. a 60 volts. Una vez terminada la electroforesis el gel se observó a través de un transiluminador de UV (Mighty bright, Hoefel Scientific Ins.) y se le tomó una foto en un analizador de imágenes (Alpha Innotech Corporation). Para determinar la concentración de RNA se hizo un análisis espectrofotométrico a 260 nm [Sambrook *J et al*, 1989] en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), asumiendo que una densidad óptica equivale a 40 µg/ml.

3.5 Obtención de RNA poli A.

Para la extracción de RNA poli A se utilizó el paquete comercial Atlas pure Total, Clontech. La obtención del RNA poli A se hizo mediante el uso de biotina y perlas magnéticas con estreptavidina como se describe a continuación. Se colocaron 15 μ l de una solución de perlas magnéticas con estreptavidina (sol. comercial) en un tubo de 0.5 ml. El tubo se puso en contacto con un magneto (Macs) y con una pipeta se eliminó el sobrenadante. Se quitó el magneto y las perlas se resuspendieron en 150 μ l solución de lavado (sol. comercial). Este procedimiento se repitió 2 veces más. Por otro lado se mezclaron en un tubo de 0.5 ml, 50 μ g de RNA total y oligo-dT biotilado (sol. comercial). La mezcla se incubó a 70° C, durante 2 min. Luego se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 min. A este tubo se le adicionaron 45 μ l de solución de unión (sol. comercial), a ésta mezcla se le agregaron las perlas previamente preparadas y se agitó durante 30 min. Se retiró el sobrenadante, se enjuagaron dos veces las perlas con 50 μ l de solución de lavado 1X (sol. comercial). Se retiró el sobrenadante y las perlas se resuspendieron finalmente en 6 μ l de H₂O libre-RNA'asas. El RNA poli A se almacenó a -70° C, hasta su uso.

3.6 Micro arreglos.

3.6.1 Marcaje de sondas de cDNA.

Para la síntesis, purificación e hibridación de las sondas se utilizó el paquete Atlas cDNA Expression Arrays, Clontech. A partir de RNA poli A se sintetizaron cDNA's de cadena sencilla, incorporando marca radioactiva durante su síntesis, en base a la siguiente reacción; en un tubo de 0.5 ml se mezclaron los siguientes reactivos:

Mezcla maestra	
4 μ l	solución de reacción 5X
2 μ l	de mezcla de dNTP's 10x (dGTP, dCTP y dTTP)
5 μ l	de alfa ³² P (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) dATP
0.5 μ l	<u>DTT (100 mM).</u>
11.5 μ l	Volumen total.

Se adicionó 1 μ l de oligonucleótidos CDS (mezcla de oligonucleótidos específicos) a las perlas con el RNA poli A, incubándose a 65° C durante 2 min. Se redujo la temperatura a 50° C por 2 min. y durante esta incubación al tubo con la mezcla maestra se le agregaron 2 μ l de transcriptasa reversa MMLV (50 ud/ μ l). Terminada la incubación se adicionó la mezcla maestra (13.5 μ l) al primer tubo y éste se incubó a 50° C por 25 min. Transcurrido el tiempo se adicionaron 2 μ l de mezcla de terminación 10X (Sol. comercial).

3.6.2 Purificación de las sondas.

A la sonda se le agregó 180 μ l de la solución comercial NT2. La mezcla se transfirió a una columna "nucleoSpin columns" y se centrifugó a 14 krpm por 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado en un tubo colector y se eliminó. A la columna se le adicionaron 400 μ l de solución comercial NT3, se centrifugó a 14 krpm por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante, se repitió tres veces. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5

ml y se le adicionó 100 μ l de buffer NE permitiendo la columna se humedeciera por 2 min. Se centrifugó (14 krpm x 1 minuto) para eluir la sonda.

3.6.3 Determinación de la incorporación de 32 P y actividad específica de las sondas marcadas.

Después de la reacción de marcaje, la actividad específica de la sonda se verificó por duplicado en un contador de centelleo (Beakman modelo LS 9000sc), adicionando 2 μ l de la sonda purificada sobre papel absorbente (Whatman DE81), colocado en un vial para contador de centelleo, se agregó 5 ml de líquido de centelleo. Se determino el número total de cuentas por millón en un canal para 32 P (Multiplicando las cuentas por un factor de dilución de 50).

3.6.4 Hibridación de las sondas de cDNA a la membrana.

Se preparó una mezcla con 6 ml de solución ExpressHyb precalentada a 68° C y 50 μ l de DNA de esperma de salmón (10 μ g/ μ l) que previamente se desnaturalizó, manteniendo la mezcla a 68° C hasta su uso. En un tubo para hibridación se colocó la membrana de 609 genes (hidratada con H₂O desionizada) se le agregó la mezcla distribuyéndola sobre toda la membrana. Se prehibrido por 30 min. con agitación continua (7- 8 rpm) en un horno de hibridación ("Hybridization incubator, Lab-line).

Se mezcló la sonda (98 μ l) con 5 μ l DNA c₀t-1 (1mg/ml) y se incubaron a 70° C por 2 min. La incubación continuó 10 min. más a 68° C. Esta mezcla se agregó a la solución de prehibridación. La hibridación se realizó durante 24 hrs. con agitación continua (7-8 rpm) a 68° C. Una vez terminada la hibridación cuidadosamente se retiró la solución de la membrana y se lavó con soluciones de baja a alta astringencia a 68° C.

Las membranas fueron colocadas en bolsas de plástico, se expusieron en cassettes con pantallas intensificadoras "Kodak Storage Phosphor Screen" ("Molecular Dynamics") a temperatura ambiente durante 72 hrs. Después de este tiempo la pantalla se analizó en un escáner óptico "phosphorimaging" (Storm 680, Molecular Dynamics Inc.) que produce imágenes digitales con las cuales se determinaron los niveles de expresión mediante el programa "AtlasImagen 2.0" (Clontech).

3.6.5 Normalización de datos.

Para hacer comparables los datos obtenidos de cada membrana se utilizó un coeficiente de normalización global del programa "AtlasImagen 2" (Clontech), donde los valores de señal de todos los genes son utilizados. El método se basa en la sumatoria de los valores de señal sobre el fondo en la membrana, como se describe a continuación:

$$\text{Coeficiente de normalización} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{intensidad} - \text{fondo})_i}{\sum_{j=1}^n (\text{intensidad} - \text{fondo})_j}$$

Donde:
 i = genes sobre la membrana 1
 j = genes sobre la membrana 2
 n = número de genes sobre la membrana

Con este método se determinan los niveles de transcripción y podemos construir “perfiles de expresión genética” con lo que se caracteriza el funcionamiento dinámico de cada gen en el genoma [Brazma A *et al*, 2000].

3.6.6 Análisis de la matriz de expresión.

La normalización de datos nos generó una matriz de expresión que se analizó mediante las dos siguientes estrategias:

1. - Comparando los perfiles de expresión de los genes por comparación de filas en la matriz de expresión.
2. - Comparando los perfiles de expresión de las muestras por comparación de las columnas en la matriz

Ambos métodos se combinaron para determinar similitudes o diferencias en los genes analizados [Brazma A *et al*, 2000].

3.6.7 Transformación de los datos para su interpretación gráfica.

Los resultados de muchos experimentos de Micro Arreglos son radios (razón de la división del valor de intensidad de experimental sobre el control). En nuestro caso la medida del radio se procesó en forma de logaritmo y se consideró que valores mayores o menores de 2 decenas en escala logarítmica, respecto al control, tienen cambios en la expresión [Eisen M B, 1999].

3.6.8 Análisis por agrupamiento jerárquico de la matriz.

Un sistema de análisis por agrupamiento para información de expresión genómica de hibridación de Micro Arreglos de cDNA se describe como algoritmos estadísticos típicos, para arreglar los genes de acuerdo a la similitud en los patrones de expresión [Eisen M B *et al*, 1998].

La finalidad de los métodos de análisis por agrupamiento es encontrar la solución posible más significativa, apoyándose de diferentes algoritmos. Existen varias categorías: Agrupamiento jerárquico; Unión completa (Agrupamiento por árbol); Unión por dos vías (Agrupamiento por bloque); Mapas de auto organización; Escalada multidimensional y Agrupamiento por la media-K (este se usa para estudios complejos de tejidos de mamíferos). El propósito del primero de estos algoritmos es utilizar medidas para unir objetos por su similitud ó distancia, basado en una o múltiples dimensiones, que nos indican la distancia geométrica entre los objetos (medida de similitud). La mas utilizada es la distancia Euclidiana.

Para nuestro agrupamiento se utilizó Agrupamiento jerárquico, en donde se usaron objetos vecinos a lo largo de los grupos [StatSoft, 2001].

Después de elegida la medida de similitud, el patrón de expresión se generó mediante un análisis no supervisado, que permite comprender cuales son los mecanismos implicados en cada tumor [Brazma A *et al*, 2000].

4. Resultados.

4.1 Características de los tumores.

Se analizaron dos tumores mamarios vírgenes a tratamiento, uno etapa II A (A) carcinoma ductil infiltrante en complejo radial, de una mujer de 48 años, con un peso de 484 mg y otro etapa III (B) carcinoma lobulillar infiltrante con patrón al centro y sólido, de una mujer de 42 años con un peso 223 mg. El RNA poli A de glándula mamaria se obtuvo de una mujer caucásica sin neoplasia mamaria (Clontech).

4.2. Obtención de RNA total.

Se obtuvo una concentración suficiente de RNA total, del tumor A, a partir de 484 mg de tejido se extrajeron aproximadamente 460 µg de RNA total según cuantificación descrita en métodos y del tumor B, a partir de 223 mg de tejido se extrajeron aproximadamente 550 µg de RNA total según cuantificación descrita en métodos, sin degradación significativa en ambos tumores (Fig. 3 y tabla 3). Se tomó el volumen suficiente para tener al menos 1 µg de RNA poli A (considerando que se tiene una eficiencia de obtención de 1-5 µg de RNA poli A por cada 100 µg de RNA total) [Duggan D J *et al*, 1999].

4.3 Obtención de la sonda a partir de RNA poli A de tumores mamarios.

El RNA fue copiado a cDNA mediante oligonucleótidos específicos, partiendo de aproximadamente 1 µg de RNA poli A (RNA's mensajeros) y marcado con dATP α³²P. Se obtuvieron actividades específicas mayores de 1.2 x 10⁶ cpm, para cada muestra. Se hibridaron durante 24 hrs. a la membrana, después de transcurrido este tiempo se expusieron en una pantalla "phosphor screen" para obtener una imagen digital en un escáner óptico (Tabla 3).

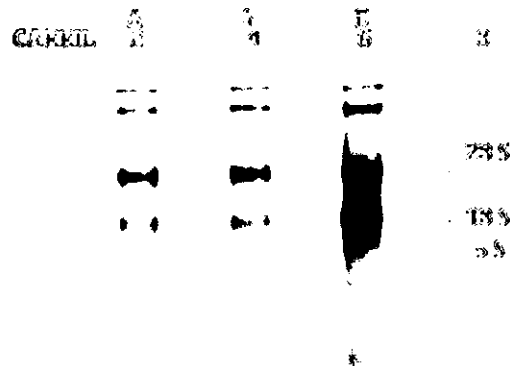


Figura 3. - RNA total. El RNA total se aisló como se describe en métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en gels de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Los carriles 2 y 4 muestran el RNA total (concentración 0.92 µg/µl) del tumor etapa II (A); En el carril 6 se observa el RNA total (concentración 1.1 µg/µl) del tumor etapa III (B). Se indican las bandas de los diferentes RNA's ribosomales.

Tabla 3. - Características de los tumores analizados y del control poli A.

Muestra	Etapa	Peso (mg)	[] RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	RNA poli A (μg) aprox.	Actividad específica (cpm)	Tiempo de hibridación a la membrana	Exposición "phosphor screen"
3431-00 (A)	II-A	484	0.92	1	1.25×10^6	24 hrs	90 hrs.
337 (B)	III	223	1.1	1	1.57×10^6	24 hrs	120 hrs.
Control (C)	Normal	---	2.2	1	12.7×10^6	24 hrs	90 hrs.

Se clasifico a los tumores utilizando los criterios del Comité Americano de Cáncer [Cotran R S *et al*, 1994]. El RNA total obtenido se resuspendió en 500 μl . Se calculo la actividad específica de la sonda obtenida a partir del RNA poli A (RNA's mensajeros) en un contador de centelleo obteniendo cpm (cuentas por minuto); se hibridó ésta a la membrana y se expuso en una pantalla "phosphor screen" 4 a 5 días

4.4 Obtención y análisis de los patrones de expresión.

En las Figuras 4, 5 y 6 se muestran las imágenes de cada membrana capturadas con un escáner óptico para fósforo "phosphorimagen" y analizadas con el programa "AtlasImagen 2", como se comenta en métodos. Cada par de manchas en la membrana representa un gen conocido. Mediante el programa "AtlasImagen 2" a cada patrón de expresión se les calculó un valor de intensidad y se aplicó una normalización de los datos en donde se consideró la intensidad, el radio, el fondo en la membrana y el número de genes que se expresan.

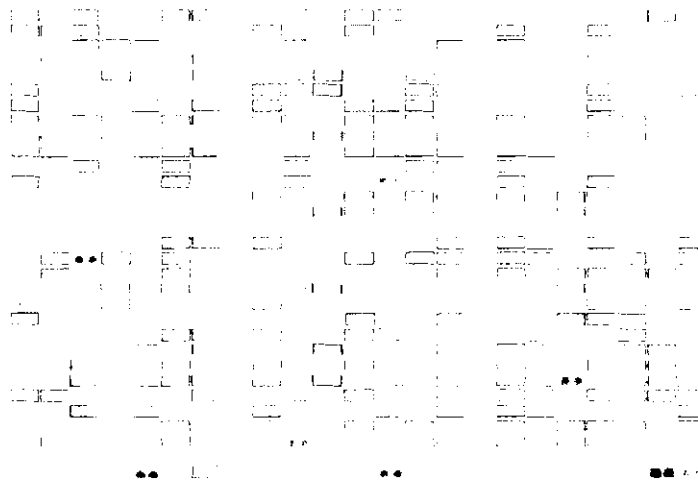


Figura 4. - Imagen de "Micro Array". Se muestran los genes que se están expresando en glándula mamaria humana no afectada. Los patrones de expresión de obtuvieron a partir del RNA poli A. Cada mancha es proporcional al monto de cDNA marcado con fósforo 32 que hibridó por duplicado con una secuencia homóloga.

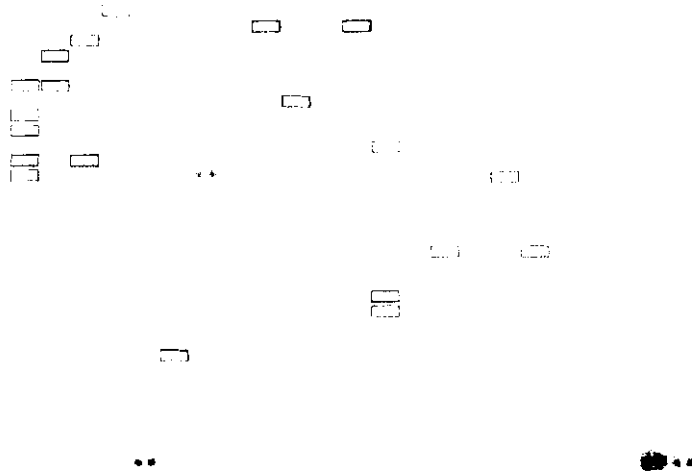


Figura 5. - Imagen de "Micro Array". Se muestran los genes que se están expresando en el tumor etapa II (3431-00). Los patrones de expresión se obtuvieron a partir de RNA poli A. Cada mancha es proporcional al monto de cDNA marcado con fósforo 32 que hibridó por duplicado con una secuencia homóloga.

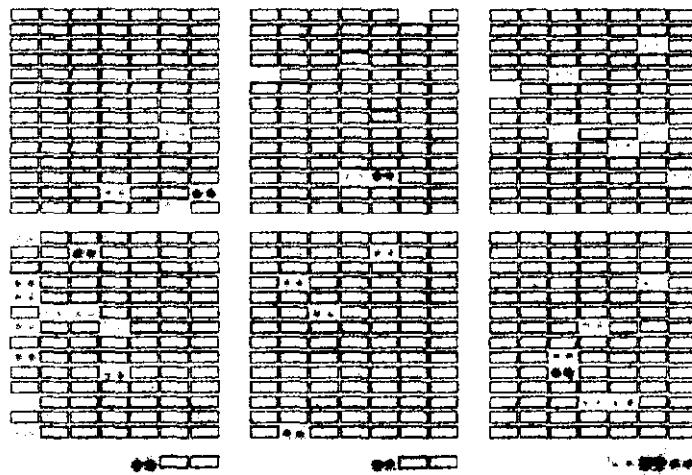


Figura 6. - Imagen de Micro Array. Se muestra los genes que se están expresando en el tumor etapa III (337). Los patrones de expresión se obtuvieron a partir de RNA poli A. Cada mancha es proporcional al monto de cDNA marcado con fósforo 32 que hibridó por duplicado con una secuencia homóloga.

4.5 Comparación de los patrones de expresión entre la muestra control y los tumores.
 Se compararon los patrones de expresión entre el control y cada uno de los tumores mamarios estudiados (3431-00 [A] y 337 [B]) (ver Fig. 7, 8, 9; Tablas 4 y 5) que generó una tabla de matrices de expresión genética (ejemplificada en tabla 4) y nos ayudó a entender la regulación genética, rutas metabólicas, mecanismos genéticos de enfermedad, y el comportamiento individual de cada muestra analizada.

Para el análisis de la matriz se determinaron los radios de cada patrón de expresión en la membrana, éstos se transformaron a logaritmo base dos. La matriz se corrió mediante el programa Cluster y Tree View (software's de Michael Einsen), bajo la condición de análisis completo con dos unidades de diferencia, es decir que el rango que está comprendido entre -0.32 y 0.26 en escala de \log_2 se consideró sin cambio en la expresión genética respecto al control (dos unidades hacia abajo o arriba). Se obtuvo un dendograma y una imagen donde se agrupan los genes que se expresan en los tumores y el control (Figura 10).



Figura 7. - Comparación de los patrones de expresión entre la glándula mamaria sin neoplasia y el tumor etapa II. Las manchas de color rojo indican sobre expresión y las azules baja expresión en el tumor. Las verdes indican que no hay diferencia y las manchas negras indican que no se expresa el gen en ninguna de las dos muestras.

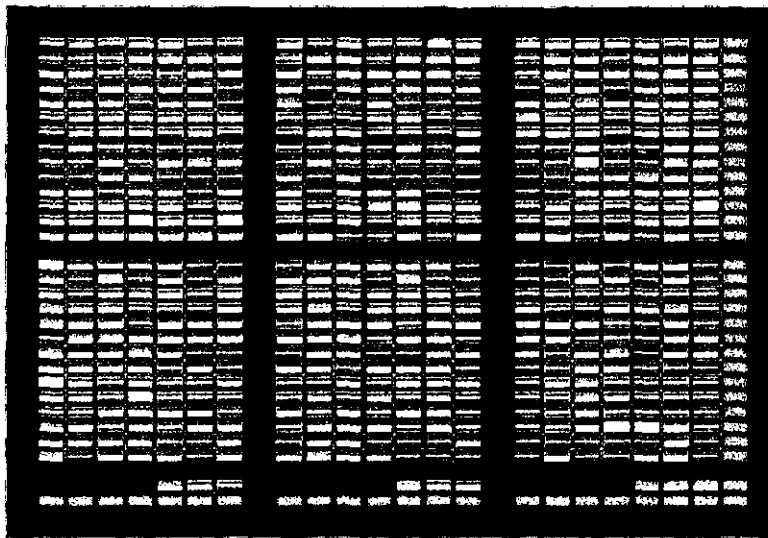


Figura 8. - Comparación de los patrones de expresión entre la glándula mamaria sin neoplasia y el tumor etapa III. Las manchas de color rojo indican sobre expresión y las azules baja expresión en el tumor. Las verdes indican que no hay diferencia y las manchas negras indican que no se expresa el gen en ninguna de las dos muestras.

Tabla 4. Expresión global de los 597 genes analizados en ambos tumores respecto al control.

Función relacionada	Número de genes.	Sobre expresión.	Baja expresión.	Sin diferencia.	Contrarios en su respuesta.	No expresados.
Reguladores de ciclo celular, reguladores de crecimiento.	98	3	31	8	49	7
Apoptosis, oncogenes, supresores de tumor.	98	4	14	6	71	3
Respuesta de daño celular, reparación y recombinación, receptores para el desarrollo y crecimiento celular.	98	13	19	1	64	1
Adhesión celular, motilidad y angiogénesis.	98	3	24	3	67	1
Reguladores de invasión, interacción célula-célula.	98	7	27	2	58	4
Factores de crecimiento.	98	19	16	0	62	1
Genes de la economía doméstica.	9	2	5	0	2	0
Controles negativos.	12	0	0	0	0	12
Total	597/609	51	136	20	373	29

Tabla 5. Matriz de genes seleccionados.

Cord.		Gen	C	A	B	Dif. (C vs. A)	Dif. (C vs. B)
Genes sobre expresados							
A2c	Concordante	Serin-treonin-cinasa (PCTK1)	207	726	241	519	34
B6l		Proteína Mdm2.	21	32	120	11	99
C2g		Metiltransferasa de DNA, 6-0-metilguanidina (MGMT).	37	161	181	124	144
D2e		Colágena alfa tipo XVIII.	184	274	241	90	57
G2l		Proteína ribosomal S9 de la subunidad 40S	4314	10754	5309	6440	995
F5d		Interleucina 12 (IL-12)	35	48	60	13	25
E5m		Contrario	Caderina 13T	8	48	60	40
Genes bajo expresados							
B3d	Concordante	Caspasa 4 (CASP 4)	289	0	181	-289	-108
E3f		c-myc	2160	549	1448	-1611	-712
A5e	Contrario	Antígeno de proliferación celular (PCNA).	394	113	241	-281	-153
C5l		HER2	87	32	60	-55	-27
D7d		Precursor B del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-B)	150	48	120	-102	-30
F1e		Factor de crecimiento endotelial vascular de unión a heparina (VEGF)	725	161	543	-564	-182
G5		Ubiquitina	12107	10625	10015	-1482	-2092

Lista de genes elegidos por su función para ejemplificar la matriz generada por el programa AtlasImagen 2.0. Se muestra el valor de intensidad normalizado y las diferencias de expresión entre los tumores (A, B) y el control (células mamarias no neoplásicas) (C). También se hace la notación respecto si concuerdan (concordante) o no (contrario) con lo reportado en la bibliografía. Cord. = coordenada del gen en el micro arreglo.

En la tabla 5 se aprecia una relación de genes elegidos por su función sobre la base de las membranas empleadas en este trabajo, tomándose dos de cada grupo, uno sobre expresado y otro bajo expresado y comparando si esta expresión coincide con lo reportado con la bibliografía. De los genes sobre expresados solamente la caderina 13T está en desacuerdo con lo que se ha reportado. Con lo que respecta a los bajo expresados solo están de acuerdo la caspasa 4 y c-myc.

De los 597 genes analizados en ambos tumores, 29 genes (2.85%) no se expresaron, 20 genes (3.35%) no presentaron diferencia en su expresión, 51 genes (8.54%) estuvieron sobre expresados, 136 genes (22.78%) baja expresión y 373 genes (62.48%) mostraron expresiones contrarias entre ambos tumores (Figura 9). De los genes del tumor etapa II, 103 genes (17%) no se expresaron, 239 genes (40%) estuvieron bajo expresados, 49 genes (8%) no presentan diferencia en su expresión y 206 genes (35%) sobre expresados. De los genes del tumor etapa III, 157 genes (26%) no se expresaron, 95 genes (16%) estuvieron bajo expresados, 93 genes (16%) no presentan diferencia en su expresión y 252 genes (42%) sobre expresados.

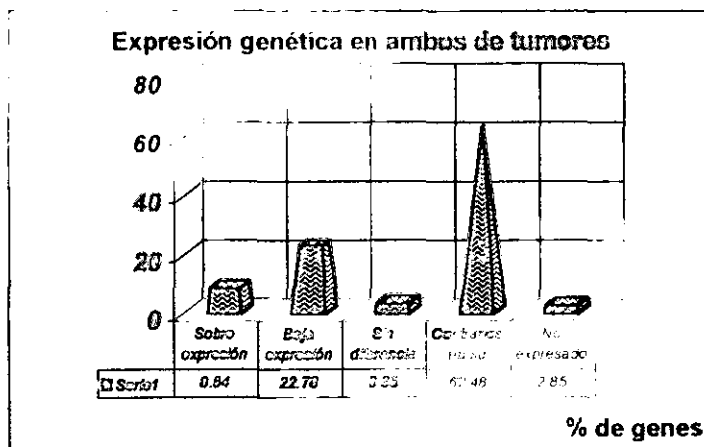


Figura 9. - Representación gráfica del porcentaje de los totales de la tabla 4. Se muestra los grupos de genes respecto a su expresión, donde aparece la cantidad de genes en la misma condición en ambos tumores.

En la figura 10 se muestran los patrones de expresión a nivel general de los tumores y el control. Debido a que el programa cluster agrupa los patrones de expresión de los diversos genes analizados por similitud o diferencia, se puede sugerir la hipótesis de que patrones de expresión localizados en las mismas ramas del dendograma están co-regulados y posiblemente relacionados funcionalmente. Como se puede observar los patrones de hibridación del tumor etapa II conservan grupos más claros y un patrón de expresión similar al control, lo cual no se observa en el tumor etapa III.

De acuerdo al análisis del dendograma las principales diferencias en los patrones de expresión entre el control y los tumores corresponden al área de los genes reguladores de ciclo celular y reguladores de crecimiento. A partir de este análisis se desprendió lo que hemos dado por llamar el "Top 20" de los genes con sobre expresión y baja expresión en ambos tumores con respecto al control. En las tablas 6 y 7 se observan los "Top 20 genes" sobre expresados y bajo expresados para las muestras analizadas. En el caso de los genes sobre expresados el 65% de ellos perteneció a factores de crecimiento y citosinas (grupo F), el 10% correspondió a genes relacionados con adhesión celular y angiogénesis (grupo D), el resto genes de los grupos A, B, C, E y G que tuvieron el mismo porcentaje del 5%. Con lo que respecta a los genes bajo expresados el 25% perteneció a genes reguladores de invasión e interacción célula-célula (grupo E), el 20% a genes relacionados con apoptosis, oncogenes y genes supresores. Un tercer grupo con un porcentaje del 15% correspondió a genes de los grupos A, C y D. Por último los grupos F y G que tuvieron un 5%.

La información generada en esta investigación se ha ido confirmando en trabajos subsecuentes al término de este reporte, por lo cual no aparecerán, pero se ha corroborado la clara división de los tejidos pertenecientes a las etapas II y III que se observa en la figura 10, además se han encontrado casos que histológicamente se comportan dentro de un grupo, pero que en un ámbito molecular se integran en otro distinto, lo cual es alentador para desarrollar una taxonomía molecular para una mejor clasificación de los tumores.

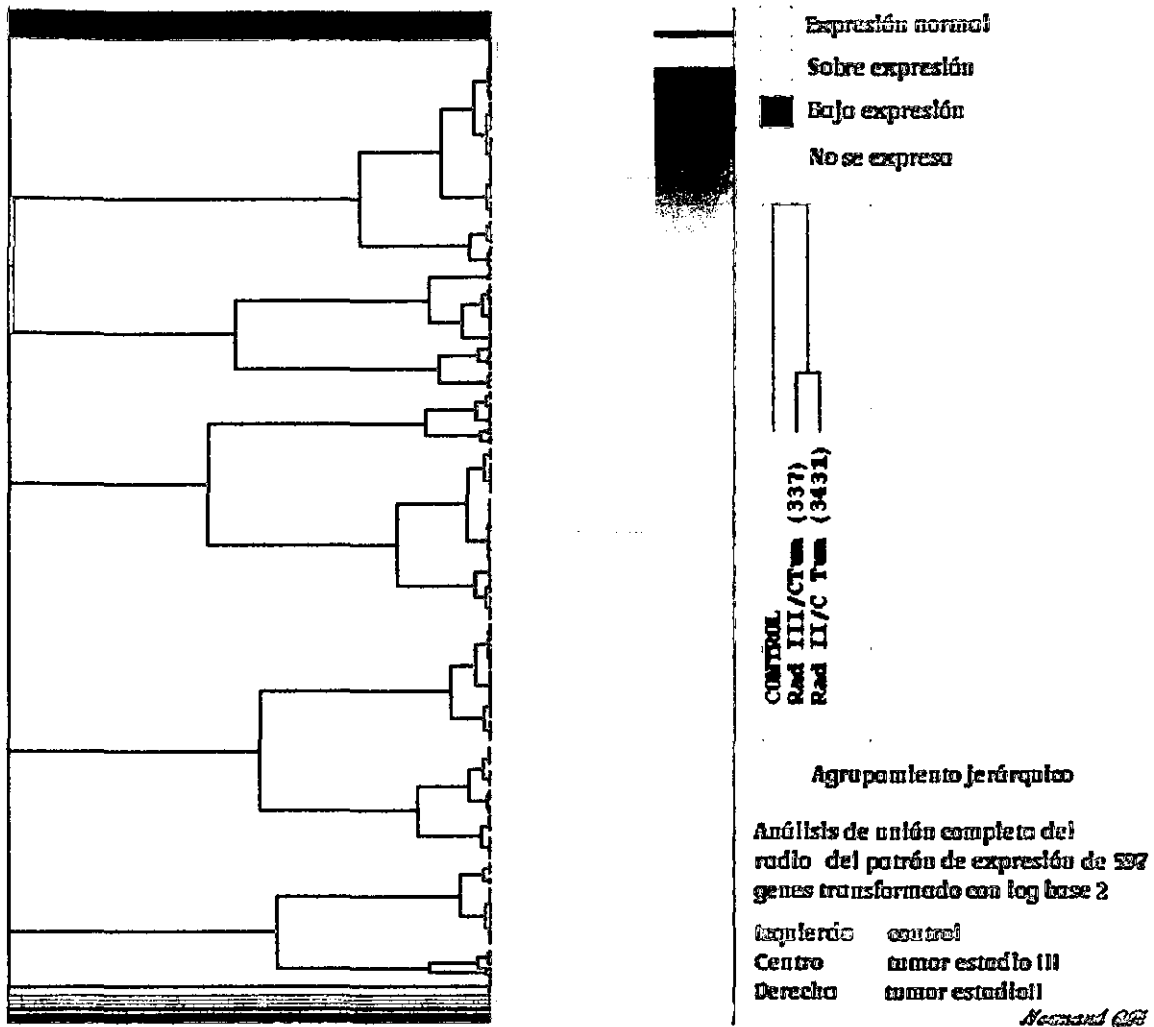


Figura 10. - Dendrograma e imagen ("cluster") del agrupamiento jerárquico de los patrones de expresión de los 2 tumores mamarios y el control. Se muestran los patrones de expresión de los tumores y el control, obtenidos mediante un análisis de agrupamiento completo como se describe en métodos. En el dendrograma cada rama corresponde a genes con patrones de expresión similares. En la imagen el área de color verde corresponde a los patrones de expresión en el control, que se consideran como normales. En el caso de los tumores el área de color verde corresponde a los patrones de expresión que son similares al control. El área de color amarillo corresponde a genes que no se expresan, tanto en el control como en los tumores. El área de color negro corresponde a genes con baja expresión en los tumores respecto al control. El área de color rojo corresponde a genes sobre expresados en los tumores respecto al control.

Tabla 6. Genes con sobre expresión ("Top 20" sobre expresados).

Sobre expresión							
Cord.	Gen	Radio Normal (NB)	Radio A/NB	Radio B/NB	Log(2) NB	Log(2) Radio A	Log (2) Radio B
F2k	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 3 (FGF3).	1	4.25	8	0	2.09	3
F7d	CD30.	1	4.25	8	0	2.09	3
F1a	Amfregulina (AR).	1	4.64	26.36	0	2.21	4.72
F5e	Interleucina 13.	1	4.64	26.36	0	2.21	4.72
F5k	Interferón gama.	1	4.64	26.36	0	2.21	4.72
C2g	Metiltransferasa de DNA, 0-0-metilguanidina (MGMT).	1	4.8	5.37	0	2.26	2.42
D4e	Integrina beta 1 (ITGB1).	1	5	19.2	0	2.32	4.26
A3c	Ciclina G2.	1	5	38.6	0	2.32	5.27
E1h	Estromeliasina 3 (MMP11).	1	5.59	2.61	0	2.48	1.38
F8n	Factor de desarrollo y crecimiento de megacariocitos.	1	6.22	3.57	0	2.64	1.84
F7m	Quimiocina IP-10 (MIG).	1	7	17.55	0	2.81	4.13
F7c	Ligando CD 27.	1	7.29	13.71	0	2.87	3.78
F7l	Receptor de interferón gama (IFNGR).	1	7.36	13.79	0	2.88	3.79
B2k	Proteína inhibidora de apoptosis 2.	1	8.33	32	0	3.06	5
E1g	Estromeliasina 2 (MMP10).	1	8.5	32.17	0	3.09	5.01
F5j	Interferón-beta (INFB).	1	8.56	10.67	0	3.1	3.42
F7j	Receptor beta de interferón-alfa (FINBR).	1	10.2	19.2	0	3.35	4.26
G7	Fosforibosil hipoxantina guanidil transferasa (HPRT)	1	10.2	19.2	0	3.35	4.26
F7n	Monocina inducida de interferón gama (gamma IP10).	1	10.89	10.16	0	3.44	3.34
F6i	Factor precursor de células "stem". (MGF)	1	25	96	0	4.64	6.58

Lista de genes que oscilan en los principales rangos de sobre expresión. Se muestra el valor del radio generado por las diferencias de los tumores respecto al control. También se muestra el valor transformado con log base 2 que se utilizó para visualizar mediante el programa Tree View los grupos. NB = Mama normal; A = Tumor etapa II; B = Tumor etapa III. Cord. = coordenada del gen en el micro arreglo.

Tabla 7. Genes con baja expresión ("Top 20" bajo expresados).

Baja expresión							
Cord.	Gen	Radio Normal (NB)	Radio A/NB	Radio B/NB	Log(2) NB	Log(2) Radio A	Log(2) Radio B
A3f	Inhibidor de ciclinas (Kip2).	1	0.02	0.55	0	-5.64	-0.86
B7b	p48.	1	0.02	0.63	0	-5.64	-0.87
F3i	Precursor de pleiotrofina (PTN).	1	0.02	0.82	0	-5.64	-0.29
B8a	Proto-oncogen c-fos.	1	0.02	0.94	0	-5.64	-0.09
D3n	Precursor de integrina alpha 6 (ITGA6).	1	0.03	0.52	0	-5.06	-0.94
G12	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa de hígado (GAPDH).	1	0.03	0.73	0	-5.06	-0.45
B1e	Proteína de inducción de diferenciación celular en Leucemia mieloide MCL-1.	1	0.03	0.79	0	-5.06	-0.34
E4c	Proteína Rho8.	1	0.04	0.75	0	-4.64	-0.42
E3l	GTPasa pequeña (rhoC).	1	0.05	0.56	0	-4.32	-0.84
D2j	Receptor de laminina (LAMR1).	1	0.05	0.76	0	-4.32	-0.4
C2e	Proteína inducible por daño celular y arresto de crecimiento GADD153.	1	0.06	0.71	0	-4.06	-0.49
E6j	Desmoplaquina I (DPI).	1	0.07	0.54	0	-3.84	-0.89
C3j	"Jagged" 1 (HJ1).	1	0.07	0.57	0	-3.84	-0.81
D5a	Paxlina.	1	0.08	0.71	0	-3.64	-0.49
E2a	Metaproteínasa 19.	1	0.08	0.73	0	-3.64	-0.45
B7g	Precursor del receptor de la proteína tirosina cinasa (SKY).	1	0.09	0.69	0	-3.47	-0.54
C2d	Proteína de reparación por excisión (ERCC5).	1	0.09	0.73	0	-3.47	-0.45
A1n	Cinasa 2 tipo CDC (CLK2)	1	0.1	0.37	0	-3.32	-1.43
A2h	Proteína cinasa relacionada a CDC2 (PISSLRE)	1	0.1	0.66	0	-3.32	-0.6
E6i	Precursor de proto caderina 43 (PCDH43).	1	0.1	0.75	0	-3.32	-0.42

Lista de genes que oscilan en los principales rangos de baja expresión, que muestra el valor del radio generado por las diferencias de los tumores respecto al control. También se muestra el valor transformado con log base 2 que se utilizó para visualizar mediante el programa Tree View los grupos. NB = Mama normal; A = Tumor etapa II; B = Tumor etapa III. Cord. = coordenada del gen en el micro arreglo.

5. Discusión.

La clasificación de tumores es un proceso difícil, basado sobre una mezcla compleja de criterios de determinación empíricos. (Valoración morfológica, extensión de la diseminación de la enfermedad y un puñado de pronósticos estadísticos). La incapacidad de clasificar los tumores en grupos clínicos y biológicos relativamente homogéneos, obstaculiza el diagnóstico y la búsqueda de terapias efectivas. La amplia diversidad de tumores, aún los que derivan del mismo tejido, presenta un reto para un temprano y acertado diagnóstico [Perou C M *et al*, 2000].

Sí todos los tumores de un diagnóstico patológico dado fueran tratados con una nueva droga y solo el 10% de éstos mostraran remisión, entonces la droga sería abandonada. Sin embargo, si una prueba diagnóstica indica que ese 10% que respondió al tratamiento, corresponde a un subtipo particular, entonces estaría claro que este fármaco trabaja efectivamente sobre ese subtipo. Este ejemplo corresponde a la historia de Herceptina (anticuerpo contra la oncoproteína de HER2/neu) [Jacobs T W *et al*, 1999 en Perou C M *et al*, 2000].

En este trabajo se determinaron los perfiles de expresión de dos tumores. Se encontraron diferencias en el comportamiento de diversos genes analizados en ambos tumores con respecto al control, un 2.85% (29 genes) no se están expresando, un 3.35% (20 genes) no presentan diferencia en su expresión, un 8.54% (51 genes) están sobre expresados, 22.78% (136 genes) están bajo expresados. Del total de los genes analizados en ambos tumores un 62.48% (373 genes) mostraron expresión contraria, lo que indica que hay divergencias en el comportamiento a nivel transcripcional, posiblemente por el desarrollo del proceso neoplásico.

Para el análisis y visualización de los patrones de expresión, los valores cuantitativos se mostraron ordenados y clasificados en un “cluster”, en donde están representados por una escala de color. Por otro lado, se crearon dendrogramas en los que se observó la relación entre tumores o genes. El producto final es una representación compleja de la expresión genética, que preserva la información cuantitativa y facilita la interpretación de ésta, lo que permite comprender el entorno biológico del desarrollo neoplásico.

Sí encontramos que dos filas son similares, podemos suponer que los respectivos genes están co-regulados y posiblemente relacionados funcionalmente [Brazma A *et al*, 2000]. Esto permite conocer el estado del proceso celular, la co-expresión de genes y/o nuevos genes que den pistas de ganancia o pérdida de función entre los tumores y el tejido no neoplásico [Eisen M B *et al*, 1998].

Existe una influencia del tipo celular sobre los perfiles de expresión, aunque cada célula posee una “firma genética” que caracteriza a éstos. Posiblemente la heterogeneidad celular de tumores sólidos (en donde diferentes partes de un tumor pueden mostrar diferentes perfiles) o la inestabilidad del RNA al tiempo que es colectado y almacenado podría ocasionar la no-reproducibilidad en los perfiles entre ensayo y ensayo. Se ha demostrado que variaciones en el manejo antes del congelamiento de la muestra tienen un mínimo efecto en el perfil global y que muestras repetidas del mismo tumor dan perfiles similares.

Ninguno de estos presenta por lo tanto dificultades insuperables, es decir, esto no compromete el análisis, en cambio permite la valoración de la contribución relativa de los diferentes tipos celulares para un perfil global.

Para verificar la aplicación de los Micro arreglos en cuanto a la distinción de los diversos patrones de expresión, la durabilidad de la identidad celular (por ejemplo antes y después de tratamiento) y ver si con ellos se puede generar una plantilla base, se han llevado a cabo diversos estudios. En el National Cancer Institute (NCI) utilizaron 60 líneas celulares para evaluar sus patrones de expresión y la relación entre ellas, hallando que los patrones primarios reflejan su origen de tipo celular, con lo que demuestran la durabilidad de la identidad celular. [Perou C M *et al*, 2000]. Una investigación comparativa entre leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda mostró una clara distinción entre las dos neoplasias, introduciendo un algoritmo denominado predictor de clase, que permite distinguir en un conjunto de genes los patrones de expresión entre la mayoría de casos. [Golub, *et al*, 2000 en Perou C M *et al*, 2000]. Un estudio sistemático de grandes linfomas difusos de células B (DLBCLs), el tipo más común de linfoma de “non-Hodgkin’s” sugiere que este tumor puede dividirse en dos subtipos biológicamente interpretables, uno con consecuencias clínicas menos virulentas y otro con un alto riesgo de progresión. Esto resalta que el perfil de expresión discrimina tumores patológicamente indistinguibles [Perou C M *et al*, 2000]. En una investigación desarrollada en 17 cultivos de líneas celulares y 65 muestras de tejido de mama en 1753 genes, se encontró que sus resultados pueden ser utilizados como plantilla para el reconocimiento de características en los patrones de expresión de tumores. Esto valida la idea de que las células neoplásicas humanas muestran expresión genética que permitirá la distinción de subtipos celulares potenciales [Ross, *et al*, 2000 en Perou C M *et al*, 2000].

Los tumores sólidos, como el de cáncer de mama presentan un mayor reto para el perfilado molecular debido a que contienen una variedad de tipos celulares que incluyen: células de carcinoma; células adherentes; células linfáticas y/o células de endotelio. Recientemente Perou *et al* exploraron el patrón de expresión de 40 tumores de mama, utilizando como patrón de referencia la expresión de líneas celulares específicas, para identificar grupos de genes co-expresados. Identificaron al menos ocho tipos diferentes de células encontradas variablemente en los tumores analizados, lo que permitió clasificarlos en diversos subgrupos: células derivadas de epitelio basal; células derivadas de epitelio ductal estrógeno positivas; células que sobre-expresan ERBB2/HER y células semejantes a tejido normal. Estos tumores fueron evaluados antes y después de quimioterapia y la clasificación previa, probó ser de gran valor, ya que los patrones de expresión permitieron reconocer individualmente a cada tumor y definir si la terapia asocia estos datos con la efectividad del tratamiento.

Hay dos conjuntos de genes con consistentes patrones de co-variación prominentes en los estudios NCI60, DLBCL y los 40 tumores, referidos como el grupo interferón-regulado y el grupo de proliferación. Estos grupos de genes definen uno de los patrones de expresión más fácilmente identificables. Sin embargo no está claro que signifiquen. Por lo que es necesario estudios de patrones de expresión que permitan definir si los subgrupos son constantes y cual es su papel en el desarrollo neoplásico.

Los estudios de medición basados en Micro arreglos distan de dar estimados de cuentas de RNAm por célula en una muestra. En el caso de buscar el comportamiento específico de un gen, las mezclas variables de tumor y tejido normal pueden confundir los análisis cuando una cuantificación específica es necesaria. En estos casos, otros métodos de medición de la expresión genética como amplificación en cadena de la polimerasa acoplada a la síntesis de cDNA cuantitativa, por ejemplo "RT-PCR MIMICS" [Siebert P D *et al*, 1993] pueden ser necesarios para definir acertadamente el número de transcritos de los genes de interés. Con lo que los resultados también sirven para validar los datos obtenidos mediante las comparaciones de los Micro Arreglos [Perou C M *et al*, 2000; Brazma A *et al*, 2000].

Los micro arreglos nos permitieron valorar los cambios asociados con el desarrollo neoplásico. En el caso de las muestras que se analizaron y en base a los reportes en la bibliografía los principales genes con sobre expresión forman parte de los procesos de proliferación neoplásica (FGF-3, CD30, MMP-11, MGF, IFNG), necrosis (gamma IP10), inhibición de apoptosis (CD30, CD27, API1), genes mitogénicos (CD30, AR), diferenciación (CD30, CD27, MGF), asociados a los sistemas de reparación del DNA (MGMT), procesos de adhesión (ITGB1, MIG), señalización (ITGB1, IFNAR2), progresión del ciclo celular (CCNG2, MGF), destrucción de matriz extracelular con subsecuente invasión de células de carcinoma (MMP-11, MMP-10), angiogénesis (MIG) e inhibición de proliferación celular (IFNG, IFNGR, IFNB1). Ocho de estos genes (FGF-3 CD30, AREG, MMP-11, CD27, IFNG, IFNGR, IFNB1) ya se han descrito asociados a diferentes tipos de neoplasias.

Con lo que respecta a los genes con baja expresión, éstos forman parte de los procesos de inhibición de proliferación celular (KIP2), ciclo celular (KIP2, RhoC, PISSLRE, p48, PTN), diferenciación (KIP2, HJ1), migración celular (PTN), inhibición de crecimiento (c-FOS), apoptosis (c-FOS, MCL1), metástasis (c-FOS, LAMR1), adhesión (ITGA6, Rho8, RhoC, PTN, SKY, PCDH43, PCDH43), transcripción (p48, Rho8, RhoC, CLK2), síntesis de DNA (RhoC), sistemas de reparación del DNA (GADD153, ERCC5), destrucción de matriz extracelular con subsecuente invasión de células de carcinoma (MMP-19). Tres de estos genes (KIP2, c-FOS, LAMR1) ya se han descrito asociados a diferentes tipos de neoplasias.

Como se comentó anteriormente estos genes pueden estar asociados al proceso neoplásico, sin embargo cabe la posibilidad de que no pudieran estar directamente relacionados con el desarrollo de este proceso, ya que hay que tomar en cuenta que el estado de la transcripción de estos genes pudiera depender de la actividad celular que domine en el tejido en el momento en que se obtuvo el RNA. Para solucionar esta posible controversia es necesario analizar un mayor número de muestras tanto de tejido normal como de tejido neoplásico.

Se han identificado genes/proteínas con valor pronóstico y/o biológico, estos biomarcadores han sido cuidadosamente identificados y validados con diferentes tecnologías. Los Micro arreglos deberán proveer un buen número de nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados para identificar asociaciones con parámetros clínicos en una manera relativamente rápida e imparcial. Además, los micro arreglos permitirán en un futuro correlacionar directamente cada uno de los factores de pronóstico a otros factores y tratar de determinar si estos actúan solos o en concierto. Hallar las

combinaciones apropiadas de algoritmos analíticos, considerando esquemas de selección de genes y métodos de verificación estadística para definir la taxonomía de los tumores es un área de intensa investigación que debe ser una prioridad para clasificar y caracterizar los tumores.

En los próximos años se podrán distinguir muchos subtipos de tumores que no habían sido previamente identificados. Pudiera haber razones técnicas, asuntos económicos o de patentes, que inhiban el uso de los micro arreglos para diagnóstico. Estudios clínicos de cada tumor serán requeridos para establecer la especificidad y el valor agregado de los micro arreglos. No serán necesarios cientos de genes para discriminar subtipos de tumor clínicamente relevantes. El reto de identificar nuevos subtipos es el de cómo tratar cada uno de esos subtipos. El predecir hábilmente el curso clínico de los tumores, no tiene un adelanto inmediato en el tratamiento. Los subtipos de progresión de bajo riesgo permitirán beneficio inmediato a estos pacientes.

Aunque el RNAm no es el último producto de un gen, la transcripción es el primer paso para el desarrollo, la función y la adaptación de un organismo y la información a nivel de transcripción es necesaria para entender la red de regulación genética. Estudios de correlación a nivel de RNAm's y proteínas ya están en camino. La habilidad de monitorear esta expresión está dada por los estudios de Micro arreglos, así se podrán construir "perfiles de expresión genética", con lo cual se caracterizará el funcionamiento dinámico de cada gen o grupo de genes en el genoma. La caracterización de los patrones de expresión de genes de tumor sin duda contribuirá al desarrollo de un sistema de clasificación mas preciso y exacto. Una nueva taxonomía molecular del cáncer con muchos subtipos de tumores reconocidos molecularmente será un recurso rico en retos para los investigadores y proveerá muchas oportunidades para mejorar el manejo clínico del cáncer.

6. Anexo de Abreviaturas.

API1	gen que codifica proteína inhibidora de apoptosis
AR	gen que codifica amfiredulina
BAX	gen que codifica proteína BAX reguladora de apoptosis
BCL-2	Proteína anti-apoptosis
BRCA1	gen de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1
BRCA2	gen de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2
cAPI1	son genes blanco de la actividad transcripcional NF-kappaB
CASP 4	gen que codifica caspasa 4
CCNG2	gen que codifica ciclina G2
CD 27	gen que codifica ligando CD 27
CD30	gen que codifica ligando CD30
c-Fos	gen que codifica al proto-oncogen fos
Ci/mmol	Curies/milimoles
CLK2	gen que codifica proteína cinasa 2 tipo CDC
CM	cáncer de mama
c-myc	gen que codifica oncogen c-myc
cpm	cuentas por minuto
dATP $\alpha^{32}P$	desoxiadenuina trifosfato marcado con fósforo 32 en posición alfa
dATP	desoxiadenuina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
DLBCLs	grandes linfomas difusos de células B
DNA c_0t-1	ácido desoxiribonucleico repetitivo
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP's	desoxinucleotidos trifosfatados
DPI	gen que codifica desmoplaquina I
DTT	Ditiotritiol
dTTP	desoxitimidina trifosfato
ERBB2/HER	gen que codifica receptor para estrógeno
ERCC5	gen que codifica proteína de reparación por escisión de DNA
EtOH	alcohol etílico
FGF3	gen que codifica factor de crecimiento de fibroblastos tipo 3
GADD153	gen que codifica proteína inducible por daño celular y arresto de crecimiento
gamma IP10	Monocina inducida de interferón gama
GAPDH	Gliceraldehido3-fosfato Deshidrogenasa de hígado
° C	grados Celsius
"HRT"	terapia de reemplazo hormonal
HPRT	Fosforibosil hipoxantina guanidin transferasa
IFNAR2	gen que codifica receptor de interferón alfa
IFNB1	gen que codifica interferón beta
IFNBR	gen que codifica receptor beta de interferón-alfa
IFNG	gen que codifica interferón gama
IFNGR	gen que codifica receptor de interferón gama
IL-12	gen que codifica interleucina 12
INFB	gen que codifica interferón-beta

ITGA6	gen que codifica precursor de integrina alpha 6
ITGB1	gen que codifica integrina beta 1
"Jagged" 1	gen que codifica ligando para el receptor Notch
Kip2	gen que codifica inhibidor de ciclinas
LAMR1	gen que codifica receptor de laminina
$\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	micro Curies sobre micro litro
MCL-1	gen que codifica proteína de inducción de diferenciación celular en Leucemia mieloide
Mdm2	gen que codifica proteína que promueve la degradación de p53
MGF	Factor precursor de células "stem".
MGMT	gen que codifica metiltransferasa de DNA, 6-0-metilguanidina
MIG	gen que codifica quimiocina IP-10
MMP10	gen que codifica estromelisinina 2
MMP11	gen que codifica estromelisinina 3
MMP-19	gen que codifica metaloproteinasas 19
μg	micro gramos
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	micro gramos sobre micro litro
NB	"normal breast" (mama no afectada)
NCI	"National Cancer Institute"
nm	nanómetros
p48	gen que codifica proteína 48; subunidad de la DNA polimerasa alfa-primasa
p53	gen que codifica supresor de tumor
PCDH43	gen que codifica precursor de proto caderina 43
PCNA	gen que codifica antígeno de proliferación celular
PCTK1	gen que codifica serina-treonina-cinasa
PISSLRE	gen que codifica proteína cinasa relacionada a CDC2
PTN	gen que codifica precursor de pleiotrofina
Rad.	Radio
Rho8	gen que codifica miembro de la súper familia de pequeñas proteínas Ras de unión a GTP
rhoC	gen que codifica GTPasa pequeña
RNA poli A	RNA mensajeros
RNA'asas	Enzimas que degradan el RNA
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero (RNA _m 's)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la reacción de transcripción reversa
SKY	gen que codifica precursor del receptor de la proteína tirosina cinasa
Sol.	Solución
Tum.	Tumor
VEGF	gen que codifica factor de crecimiento endotelial vascular de unión a heparina
VEGF-B	gen que codifica precursor B del factor de crecimiento endotelial vascular

7. Bibliografía.

1. Atlas cDNA Expression Arrays Kit. www.clontech.com. CLONTECHniques (2000).
2. Atlas Pure Total RNA Labeling System Kit. www.clontech.com. CLONTECHniques (2000).
3. Berry D A, Parmigiani G, Sanchez J, Schildkraut J & Winer E (1997) Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *Journal of the National Cancer Institute* 89(3): 227-238.
4. Bertram J S (2001) The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 21: 167-223. www.elsevier.com/locate/mam
5. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, Loriod B, Jacquemier J, Viens P, Jordan B, Birnbaum D & Nguyen C (2000) Gene expression profiling of primary carcinomas using arrays of candidate genes. *Human Molecular Genetics* 9(20): 2981-299
6. Bishop J (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annual Review Biochemical* 52: 301.
7. Brazma A & Vilo J (2000) Gene expression data analysis. Minireview. *FEBS Letters*, 480: 17-24.
8. Broet P, de la Rochefordiere A, Scholl S M, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC, Pouillart P & Asselain B (1995) Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *Journal of Clinical Oncology* 13(7): 1578-1583.
9. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996) Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347(9017): 1713-1727.
10. Cotran R S, Kumar V, Robbins S L & Schoen F J (Eds) (1994) *Pathologic basis of disease*. 5th edition. Ed. Saunders.
11. DeVita T V Jr., Hellman S & Rosenberg S A (1997) *Principles & Practice of Oncology*, Fifth Edition; Cancer; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
12. Duggan D J, Bittner M, Chen Y, Meltzer P & Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 21:10-14.
13. Eisen M B (1998-99) *Cluster and Tree View*. Manual. Stanford University. 1-20.
14. Eisen M B, Spellman P T, Brown P O & Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14863-14868.
15. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming Md, DB De Zimonjic, Donaher J, Popescu Nc, De Hahn Wc & De Weinberg Ra (2001) Células humanas de cáncer de mama generadas por la transformación oncogénica de células epiteliales mamarias primarias. *El revelador* 15(1): 50-65.
16. Fisher B, Fisher E R, Redmond C & Brown A (1986) Tumor nuclear grade, estrogen receptor, and progesterone receptor: their value alone or in combination as indicators of outcome following adjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 7(3): 147-160
17. Ford D, Easton D F, Bishop D T, Narod S A & Goldgar D E (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium*. *Lancet* 343(8899): 692-695.
18. Frank T S, Manley S A, Olopade O I, Cummings S, Garber J E, Bernhardt B, Antman K, Russo D, Wood M E, Mullineau L, Isaacs C, Peshkin B, Buys S, Venne V, Rowley

- PT, Loader S, Offit K, Robson M, Hampel H, Brenner D, Winer E P, Clark S, Weber B, Strong L C & Thomas A (1998) Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *Journal of Clinical Oncology* 16(7): 2417-2425.
19. Gustafsson A, Tartter P I, Brower S T & Lesnick G (1994) Prognosis of patients with bilateral carcinoma of the breast. *Journal of the American College of Surgeons* 178(2): 111-116.
 20. Hall J M, Lee M K, Newman B, Morrow J E, Andersen L A, Huey B & King M C (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250(4988): 1684-1689.
 21. Healey E A, Cook E F, Orav E J, Schnitt S J, Connolly J L & Harris J R (1993) Contralateral breast cancer: clinical characteristics and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 11(8): 1545-1552.
 22. Jacobs T W, Gown A M, Yaziji H, Barnes M J & Schnitt S J (1999) Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *Journal of Clinical Oncology* 17(7): 1983-1987.
 23. Leena Hilakivi-Clarke (2000) Estrogens, BRCA1, and Cancer. *Cancer Research* 60: 4993-5001.
 24. Medline. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 25. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal P A, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett L M & Ding W (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266(5182): 66-71.
 26. National Cancer Institute (2001) Breast Cancer <http://www.cancernet.nci.nih.gov/index.html>
 27. Orel S G, Troupin R H, Patterson E A & Fowble B L (1992) Breast cancer recurrence after lumpectomy and irradiation: role of mammography in detection. *Radiology* 183(1): 201-206.
 28. Perou C M, Brown P O & Botstein D (2000) Tumor classification using gene expression patterns from DNA microarrays. *New technologies for life sciences: A Trend Guide/Review* 67-75.
 29. Rosen P P, Groshen S, Kinne D W & Norton L (1993) Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *Journal of Clinical Oncology* 11(11): 2090-2100.
 30. Sambrook J, Fritsch E F & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2^o Ed. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 31. Siebert P D & Larrick J W (1993) PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques*; 14:244-249.
 32. StatSoft Inc. (1984-2001) *Cluster Analysis. Statistica* (www.clusteranalysis) 1-6.
 33. The Breast Cancer Linkage Consortium (1999): Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 91(15): 1310-1316.
 34. Vogelstein B, Kinzler K, Couch J F & Weber L B (1998) *Breast Cancer*. Mc Graw Hill. Chapter 30: 537-550
 35. Yokota J (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21(3): 497-503
 36. Zheng L, Li S, Boyer Tg & Hees Wh (2000) Learn lessons of BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 19(53): 6159-75.