



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL DE PEDIATRIA CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL TELÓMERO EN TEJIDO
NEOPLÁSICO MAMARIO DE MUJERES MEXICA.

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA
P R E S E N T A:
DRA. I. FÁTIMA SIERRA PINEDA



I. M. S. S. C. M. N.
HOSPITAL DE PEDIATRIA
FEB. 25 2004
D. TO. DE ENSEÑANZA
ASESOR DE TESIS: E IN ESTI...

SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

ASESOR DE TESIS: E IN ESTI...

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ



Fuente

2004



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sierra Pineda I

Fátima

FECHA: 25- Febrero-04

FIRMA: 

Con cariño a:

Mi esposo, Jair y mi hija Marifer por ser la luz que ilumina mi vida.

A mis Profesores:

Dr. Diego, Dr. Salamanca, Dra. Araujo, Dra. Peñalosa, Dr. Coral, Dra. Cervantes, por guiarme hacia el camino del conocimiento.

A mis amigos:

Eunice, Amilcar, Jorge y Boris gracias por hacerme parte de sus vidas.

**DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL TELÓMERO EN TEJIDO
NEOPLÁSICO MAMARIO DE MUJERES MEXICANAS**

Tesis para obtener el grado de Especialista en Genética Médica.

Tesista: Dra. I. Fátima Sierra Pineda
Médico Residente de Genética Médica.

Tutor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda¹.
Cotutor: Dr. Fabio Salamanca Gómez¹.

¹Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Hospital de Pediatría.
Centro Médico Nacional Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social.
México, D.F.

INDICE

	Página
RESUMEN	4
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO	15
HIPÓTESIS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	32
ANEXOS	34
BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN.

Factores socio-epidemiológicos han ocasionado que las neoplasias malignas se incrementen significativamente en nuestra población; en nuestro país el cáncer de mama ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años. La etiología del cáncer de mama se desconoce, no obstante se presume que factores genéticos, hormonales, ambientales y nutricionales, influyen en su manifestación. En el área molecular se ha demostrado, que el proceso neoplásico es ocasionado por la acumulación sucesiva de alteraciones en genes involucrados en proliferación, diferenciación, muerte celular, reparación del DNA y mantenimiento del tamaño de los telómeros.

Los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas, cuya función es evitar que se fusionen unos con otros. La hipótesis del envejecimiento celular e inmortalización regida por el tamaño de los telómeros, ha llevado a sugerir que el tamaño de éstos sirve como un reloj biológico que regula el ciclo de vida de las células normales.

El objetivo de este trabajo, fue determinar el tamaño del telómero en tumores mamarios de mujeres mexicanas, mediante la técnica de fragmentos de restricción (TRF). La población en estudio fueron mujeres mexicanas con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama intraductal en estadio II que no hubiesen recibido ningún tipo de tratamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los telómeros de tejido neoplásico se encontraban de menor tamaño comparados con los de tejido no neoplásico. Esto puede explicarse debido a que en el 70% de las neoplasias p53 y RB se encuentra mutado lo que hace que pierdan la capacidad de actuar como punto de control y hace que la célula no se dirija hacia apoptosis y la célula se inmortaliza. Otro mecanismo que explicaría los hallazgos es que existe una respuesta celular a telómeros cortos, que puede seguir 2 vías: la primera es que cuando los puntos de control se encuentran intactos ocurre arresto proliferativo o apoptosis.

En la segunda si estos controles se encuentran alterados puede ocurrir fusión entre cromosomas, recombinación no-recíproca lo que conduce a una inestabilidad genómica que activa a la telomerasa inmortalizando a la célula. La actividad de la telomerasa puede cuantificarse de tal forma que puede usarse como marcador de diagnóstico y pronóstico, aunado a esto, en el futuro se podrán emplear inhibidores de la telomerasa, los cuales funcionan inhibiendo directamente a la telomerasa o bloqueando su acceso al telómero.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Factores socio-epidemiológicos han ocasionado que las neoplasias malignas se incrementen significativamente en nuestra población, por lo que es una necesidad implementar el estudio de estas enfermedades a diferentes niveles (1,2).

Las enfermedades oncológicas son ahora, uno de los principales problemas de Salud Pública representando el 24% del total de muertes en la población (3,4).

En este país las cinco principales causas de muerte por cáncer en el sexo masculino son: pulmonar, 32%; próstata, 14%; colon y recto, 9%; leucemia y linfoma, 9%, y páncreas. En el sexo femenino las causas principales de muerte por cáncer son: pulmonar, 25%, mamario, 17%; colon y recto, 10%; leucemia y linfoma, 8%; y ovario, 6% (5).

El cáncer es resultado de una pérdida de la regulación de aspectos críticos de la función celular, como proliferación, diferenciación y apoptosis.

Sin la restricción apropiada de estos procesos, las células neoplásicas se reproducen en gran número, invaden estructuras adyacentes y desarrollan colonias metastásicas (6).

El conocimiento actual acerca de la etiología y control del cáncer surgió, en gran medida, de la epidemiología, por estudios observacionales, correlaciones internacionales entre poblaciones y emigrantes, encuestas transversales por estudios caso-control y de cohorte son las bases para llegar a conclusiones respecto a la etiología.(5)

El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes en Estados Unidos, representando el 32% de todas las neoplasias en mujeres de 40 a 44 años (7). En nuestro País el cáncer de mama ocupa el segundo lugar como causa de muerte, en mujeres mayores de 35 años, representando el 17% (8).

El adenocarcinoma intraductal es el principal tipo histológico asociado a esta neoplasia con una frecuencia del 96.8% (9,10).

Esta neoplasia presenta una tendencia al aumento de la mortalidad en nuestro país ya que en 1940 se registró una tasa de 32.2 defunciones por 100,000 habitantes, en 1992 la tasa fue de 50.4 por 1000, en 1994 la mortalidad por cáncer de mama de acuerdo al Hospital de Oncología CMNSXXI fue de 6 por 100 000 mujeres solamente superado por el cáncer cervicouterino. El grupo más afectado de acuerdo a la edad es de 30 a 60 años (11,12).

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea causada por la interacción de factores genéticos y no genéticos.

Mediante diversos estudios moleculares se ha demostrado la asociación de diversas alteraciones moleculares con el cáncer de mama, como aumento en la cantidad de DNA (13), alteraciones citogenéticas como translocaciones en los cromosomas 7, 18 y 20, eliminaciones en los cromosomas 17 y 19, rearrreglos estructurales en diversos cromosomas (14-16), la amplificación de protooncogenes como MYC o ERBB2 (17-19).

En casos hereditarios mutaciones en al menos cinco genes de susceptibilidad (BRCA1, BRCA2, p53 y ATM) (20-23) y la pérdida de heterocigocidad en diversos cromosomas (24-29).

En fechas recientes se ha establecido el papel importante que desempeñan los telómeros no solo en el cáncer de mama sino en el cáncer en general (30).

En 1978, Elizabeth Blackburn y Joe Gall describieron una secuencia de repetidos inusual en el extremo cromosómico del protozoario *Tetrahymena*, a estas estructuras se les denominó telómeros (31).

Los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas de eucariontes y que tienen funciones de protección evitando que los extremos de éstos formen estructuras alteradas o que se fusionen extremos con extremos. Se ha descrito que al telómero se le asocian diferentes proteínas formando una estructura conocida como telosoma [Fig.1] (32).

En células humanas los telómeros son secuencias de repetidos de 5'-TTAGGG-3' de 2 a 15 kb dependiendo de la edad del individuo (33). En las células somáticas, en cada división celular se pierden de 50 a 100 pb hasta llegar a un momento crítico que ocasiona que la célula ya no replique su material genético alcanzando la senescencia celular y con esto la muerte por apoptosis (34). Esto hace que pierda su potencial proliferativo y sirve como reloj mitótico para la senescencia celular [Fig.2].

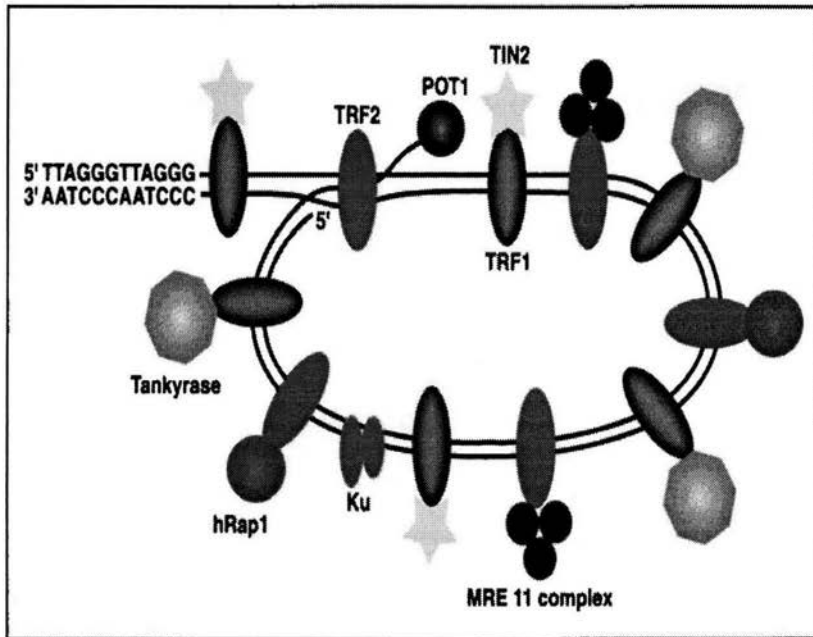


Figura 1. Representación esquemática del telosoma. Está formado por secuencias de ácidos nucleicos repetidos y proteínas de unión específicas que funcionan como unidad para proteger los extremos de los cromosomas y regular el tamaño del telómero (47).

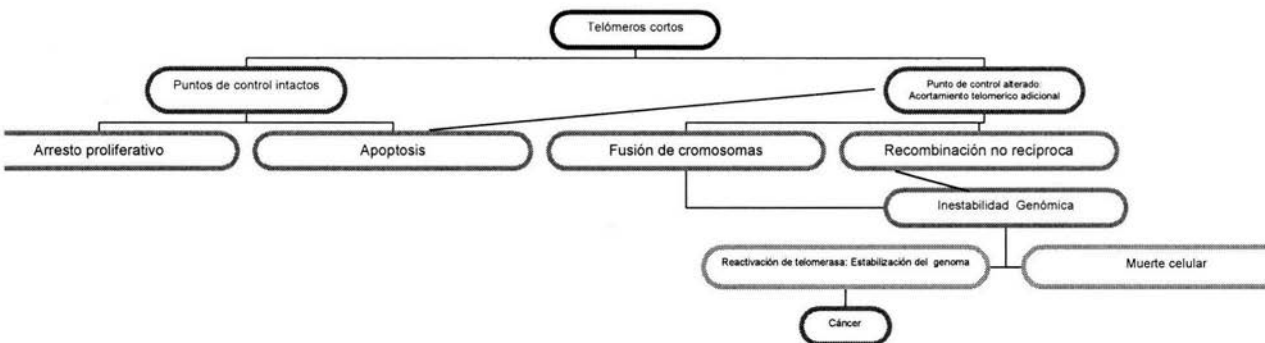


Figura 2. Respuesta celular a telómeros cortos. En células somáticas normales, los telómeros cortos activan puntos de control que inducen apoptosis o arresto proliferativo. Infrecuentemente, en ausencia de función de puntos de control, se activa la telomerasa y se mantienen los telómeros conduciendo a cáncer. (42)

Además de estas secuencias repetidas, hay proteínas que sirven para regular la estructura del telómero, como las TRF1 (factor 1 repetido telomérico) y TRF2 que se unen al DNA de doble cadena telomérico y juegan un papel importante en la regulación del tamaño del telómero (35). Van Steensel y de Lange demostraron que TRF1 es un regulador negativo del tamaño del telómero. Por otro lado TRF2 juega un papel esencial en proteger la integridad telomérica (36). Estudios bioquímicos indican que TRF2 influye en la formación del asa del telómero, indicando que TRF2 ayuda a mantener la estructura secundaria del telómero. Recientemente, una tercera proteína de unión al telómero, Pot1, se une a la cadena sencilla del DNA telomérico (37).

TRF2 interactúa con otras proteínas, incluyendo la proteína humana Rap1 y el complejo Mre11, el cual está implicado en la respuesta al daño celular (38).

El principal determinante de la longitud del telómero es una DNA polimerasa específica llamada telomerasa. Esta enzima sintetiza *de novo* el telómero y está íntimamente involucrada en el potencial proliferativo de las células germinales y neoplásicas.

Esta ribonucleoproteína está compuesta de una subunidad catalítica, la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) y un molde de RNA [Fig.3] y funciona como una transcriptasa reversa que usa al ácido ribonucleico como templado para la síntesis del telómero (39,40).

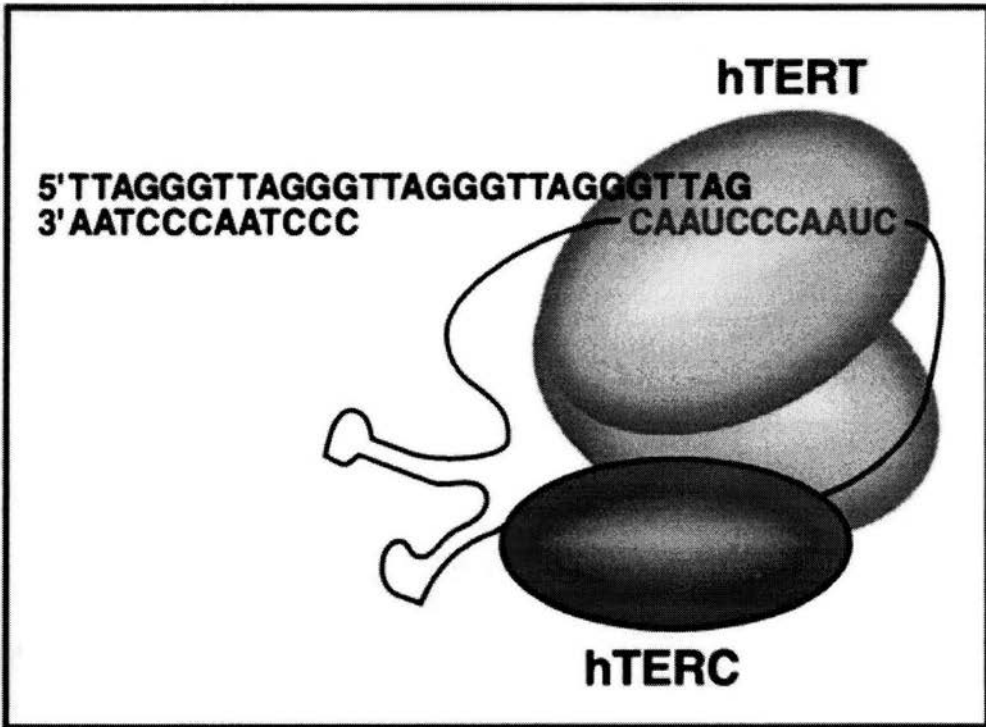


Figura 3. Representación esquemática de la telomerasa. La telomerasa esta compuesta de una subunidad catalítica hTERT y una cadena de RNA (hTERC) necesaria para el inicio de la replicación. (47)

La telomerasa está activa en la embriogénesis temprana y en muchas células inmortales, lo que hace que los telómeros mantengan su tamaño y el potencial proliferativo de la célula. Durante la diferenciación celular y en las células somáticas esta actividad enzimática se encuentra regulada negativamente (41).

En las células telomerasa negativas, como consecuencia de cada división celular sus telómeros se acortan hasta que las células alcanzan una vejez replicativa. Se le atribuye a este mecanismo la responsabilidad del número de divisiones celulares que una línea celular puede tener. En la vejez replicativa sí se activa p53 y RB, las células mueren por apoptosis.

Recientemente se ha demostrado en algunas líneas celulares derivadas de neoplasias, la existencia de una ruta alterna para la síntesis del telómero, independientemente de la telomerasa y que también permite la inmortalidad celular (42).

La transformación de una célula normal somática en célula neoplásica esta asociada a la activación de la enzima telomerasa y al mantenimiento del tamaño del telómero.

Debido a que el mantenimiento del tamaño del telómero se encuentra en muchas células neoplásicas y que normalmente en una célula somática normal presenta acortamiento, es considerado su uso como valor pronóstico de cáncer.

El tamaño promedio de los telómeros en células neoplásicas es de cerca de 5 kb; aquellos con tamaños entre 3 y 5 kb se consideran cortos, y aquellos con tamaños entre 7 y 9 kb son considerados largos (41).

Se ha establecido que aquellas células neoplásicas con telómeros cortos pueden responder rápidamente a terapia con inhibidores de la telomerasa en un solo ciclo, pero aquellos con telómeros largos requieren además de inhibidor de la telomerasa durante tiempo prolongado, puede requerir asociación con quimioterapia o tratamiento quirúrgico para reducir la masa tumoral.

El tamaño del telómero es un marcador único ya que en células somáticas de adulto deben encontrarse cortos, sin embargo en la célula neoplásica se mantiene.

La relación entre telomerasa, telómero y cáncer es compleja, sin embargo, el aumento de la actividad de la telomerasa esta relacionada con pobre pronóstico.

Estos hallazgos son herramientas fundamentales que en un futuro podrían emplearse como marcadores diagnósticos y de pronóstico del proceso neoplásico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen muchos mecanismos moleculares asociados al desarrollo de una neoplasia, uno de ellos es la actividad constitutiva de la telomerasa, lo que ocasiona que los telómeros no se recorten.

Por lo que se considera que el tamaño de los telómeros puede servir como factor pronóstico, por lo que es importante plantearnos la siguiente pregunta:

1. ¿Cuál es el tamaño del telómero en pacientes con cáncer intraductal de mama de mujeres mexicanas?

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las neoplasias mas frecuentes en nuestra población por lo que es importante determinar el tamaño de los telómeros debido a que esto nos podría orientar hacia el pronóstico de la paciente y el manejo a seguir.

OBJETIVO

-Determinar el tamaño del telómero en tejido neoplásico mamario y no neoplásico, de pacientes de sexo femenino mexicanas con cáncer intraductal de mama estadio II.

HIPÓTESIS

1. Los telómeros de células somáticas no neoplásicas serán de 3 a 5 kb
2. El tamaño de los telómeros será mayor en células neoplásicas mamarias que en células mamarias no neoplásicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO:

El presente estudio es observacional con un diseño transversal descriptivo que corresponde al área de pronóstico y sobrevida.

UNIVERSO DE ESTUDIO:

Se estudiarán pacientes mexicanas con padres y abuelos nacidos en México, mayores de 35 años que acuden al Hospital de Oncología CMNSXXI y Hospital General de zona de 1ª Los venados, con diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer intraductal de mama en estadio II.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Mujeres mexicanas mayores de 35 años con diagnóstico de cáncer intraductal de mama en estadio II que no hayan recibido ningún tratamiento ni transfusión sanguínea en los 4 meses previos a la obtención de la muestra.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Mujeres que no sean mexicanas, mujeres con tratamiento, mujeres con cáncer de mama hereditario.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Mujeres con otro tipo histológico de cáncer de mama.

Que la muestra no sea fresca y que se encuentre en parafina.

VARIABLES

INDEPENDIENTES

A) Cáncer de mama: corresponde al lugar de aparición de la masa tumoral.

B) Estadio clínico de la enfermedad: Corresponde al grado de infiltración neoplásica.

Variable cualitativa ordinal: II.

C) Histología: Corresponde al tipo histológico de la neoplasia

VARIABLE DEPENDIENTE

C) Tamaño del telómero: Corresponde al tamaño de la secuencia expresado en pares de bases.

TAMAÑO DE MUESTRA:

No requiere cálculo de muestra ya que se trata de un estudio descriptivo en el que se incluyeron 2 muestras de tejido tumoral y 2 muestras de tejido normal como control.

PROCEDIMIENTOS:

1. Obtención de la muestra (Anexo 1)
2. Corroboración de criterios de inclusión y exclusión (Tabla 1)
3. Llenado de la hoja de recolección de datos (Anexo 2)
4. Extracción de DNA (Anexo 3)
5. Determinación del tamaño del telómero mediante el ensayo TRF

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se realizó la determinación del tamaño del telómero en pacientes mexicanas mayores de 35 años con cáncer de mama intraductal en estadio II en tejido neoplásico y se tomó un control de tejido normal enviados del hospital de Oncología CMNSXXI y del Hospital General de Zona 1ª “Los Venados”, procesados en el laboratorio de Genética Molecular de la U.I.M. Genética Humana del hospital de Pediatría CMNSXXI.

ASPECTOS ETICOS

Se realizó carta de consentimiento informado (anexo 5) y el proyecto fue aprobado por los comités de Investigación y de Ética del Instituto.

RESULTADOS

1. Obtención de un banco genómico, a partir de tejido mamario con diagnóstico de cáncer de mama intraductal.

Se extrajo el DNA de tejido neoplásico y no neoplásico de 2 pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma intraductal en estadio II, sin antecedentes de cáncer familiar y de uso de anticonceptivos.

Las concentraciones de DNA obtenidas fueron de 30-850 ng y con una pureza de 1.5 a 2.0 unidades de absorbancia.

El DNA mostró una degradación mínima como se observa en la figura 4 (A y B) y corresponde a DNA de alto peso molecular.

2. Posterior a la obtención del DNA se realizó restricción con la enzima Hinf I.

En la figura 5, se muestran los productos de la restricción sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%; en el primer carril se observa el DNA de tejido normal y en el 2º carril se observa el DNA del tejido neoplásico de la misma paciente. En los carriles 3 y 4 se observan el DNA de tejido normal y neoplásico de la segunda paciente y en el último carril se observan las bandas del marcador de peso molecular λ Hind III. En esta figura se observa un barrido continuo que corrobora la restricción total de las muestras.

3. Los productos de este gel fueron transferidos a una membrana de nylon. Se hibridaron con una sonda telomérica marcada previamente con digoxigenina (DIG High DNA labeling and detection starter kit II; Roche) y después fue expuesta en una placa autoradiográfica (Figura 6). En la Tabla II se muestra el tamaño del telómero de las muestras analizadas.

Paciente	Edad	AHF	Anticonceptivo	M Gesta	Dx.histop.	Etapa	TNM	Tam.Tumor
No. 1	54a	No	No	12a 4	Ca.ductal I.	IIA	T1N1M0	2cm
No. 2	69a	No	No	? 6	Ca.ductal I.	IIA	T2N0M0	2.7cm

Tabla I. Características clínicas de las pacientes. La paciente No. 1 corresponde a una persona del sexo femenino de 54 años con diagnóstico de carcinoma ductal en etapa IIA con tamaño del tumor de 2cm, sin antecedentes heredo familiares.

La paciente No. 2 corresponde a una persona de 69 años, con diagnóstico de carcinoma ductal en etapa IIA con tamaño de tumor de 2.7cm. AHF: Antecedentes heredofamiliares. M: Menarca, TNM: Tumor, Ganglio Linfático y Metástasis.

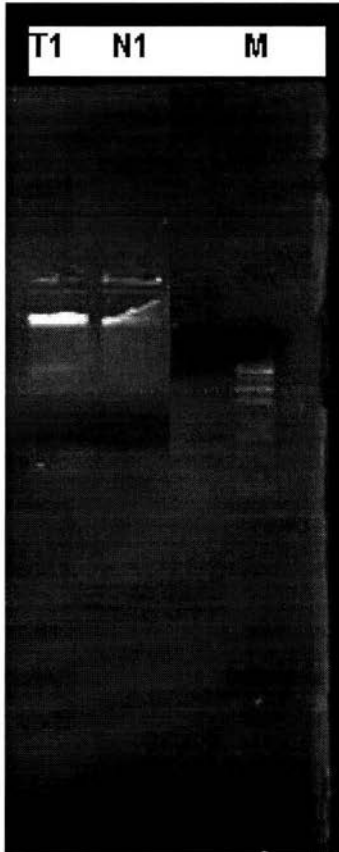


Figura 4A. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, que muestra el DNA de tejido mamario. T1 corresponde al DNA de tejido neoplásico y N1 corresponde al DNA de tejido no neoplásico. M: Marcador PMc.



Figura 4B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra el DNA de tejido mamario. N2 corresponde al DNA de tejido no neoplásico de la segunda paciente y T2 muestra al DNA de tejido neoplásico. M: Marcador PMc.

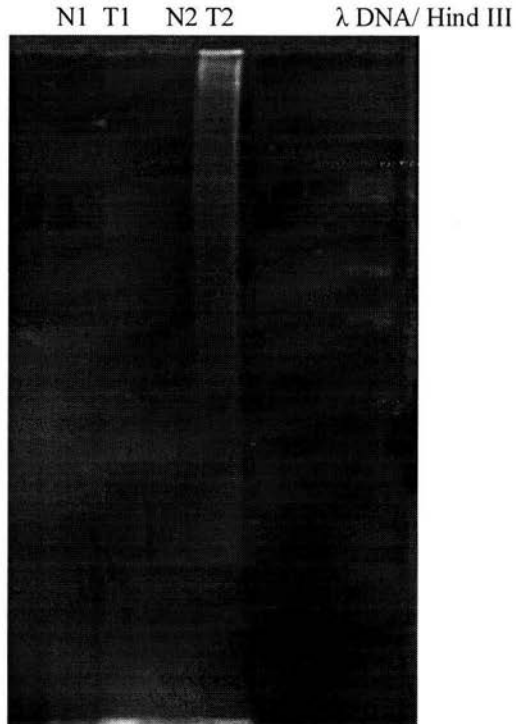


Figura 5 Electroforesis de DNA en gel de agarosa al 0.7%. En el carril N1 se muestra la restricción del DNA obtenido de tejido no neoplásico; en T1 se muestra la restricción del DNA del tumor de la misma paciente. En N2 y T2 (carriles 3 y 4) se muestran las restricciones del DNA de tejido normal y tumoral de la 2ª paciente. El último carril el marcador de peso molecular λ Hind III.

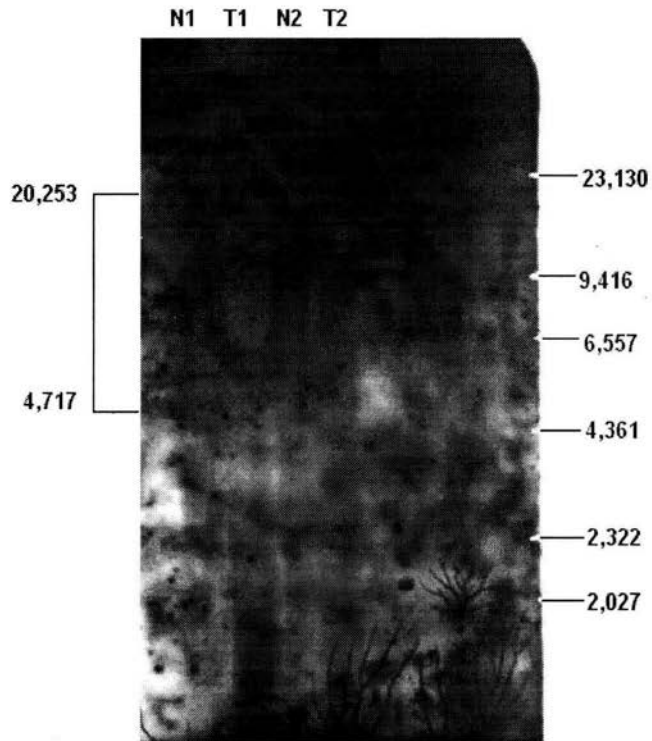


Figura 6: Placa autoradiográfica donde se determinó el tamaño del telómero.

Placa autoradiográfica resultado de la exposición de la membrana y ubicación de las bandas del marcador de peso molecular en la membrana de nylon, utilizados como referencia para determinar el tamaño del telómero. En el carril N1 se muestra el telómero de tejido no neoplásico; en T1 se muestra el telómero de tejido tumoral de la misma paciente. En N2 Y T2 (Carriles 3 y 4) se muestran los telómeros de tejido no neoplásico y neoplásico de la 2ª paciente. Las muescas nos indican el nivel del marcador de peso molecular λ Hind III.

Paciente	Tejido no neoplásico	Tejido neoplásico
No 1	12.4 kb	1.2 kb
No 2	11.0 kb	8.9 kb

Tabla 2. Tamaño del telómero en muestras analizadas. En la paciente No. 1 de 54 años se observa que en el tejido no neoplásico el telómero se encuentra largo, a diferencia del tamaño del telómero en el tejido neoplásico que se encontró corto de 1.2kb. En la paciente No. 2 el tamaño del telómero no neoplásico fue de 11.0 kb a diferencia del telómero de tejido neoplásico que es de 8.9 kb. Esto puede ser un fenómeno poco común que puede explicarse por la crisis celular o por mutación de p53 y RB.

DISCUSIÓN

Una de las principales causas de muerte en mujeres mexicanas es el cáncer de mama, ocupando el segundo lugar en frecuencia de mortalidad, por lo que se considera un problema de Salud Pública en el que es necesario implementar métodos que hagan más fácil su diagnóstico, ya que estas neoplasias si se detectan de manera temprana el pronóstico es favorable.

El cáncer de mama es una neoplasia que se origina en el epitelio de la glándula mamaria siendo el adenocarcinoma el tipo histológico más frecuente.

Una de las características buscadas en los antecedentes de las pacientes a estudiar es que fuera cáncer esporádico, ya que ha sido poco estudiado y se sabe menos acerca de los genes que participan en la producción de la neoplasia, no sucede así con el cáncer de mama hereditario en el que se sabe que están implicados genes como BRCA1 y BRCA2 los cuales son considerados como genes con susceptibilidad a cáncer.

Los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas y sirven de protección para evitar que se fusionen extremos con extremos, además de que desempeña un papel importante en procesos celulares que incluyen organización de la cromatina y control de la proliferación celular. En células somáticas en cada división celular se pierden de 50 a 100 pb lo que hace que vayan perdiendo su capacidad replicativa y alcanzan la senescencia celular y la muerte por apoptosis.

En células humanas presenescentes, la actividad de la telomerasa se encuentra reprimida y los telómeros de estas células se acortan con las divisiones sucesivas. En contraste, muchas líneas celulares derivadas de neoplasias son capaces de replicar ilimitadamente su material replicativo y expresar actividad de telomerasa para mantener estable el tamaño del telómero. La correlación entre el tamaño del telómero estable y la capacidad replicativa ilimitada indican que los telómeros pueden servir como un mecanismo molecular que cuenta las divisiones celulares y limita el periodo de vida celular. De acuerdo con estas observaciones, en las células inmortales, la inhibición de la telomerasa por métodos genéticos de antisentido o farmacológicos ocasionan el acortamiento del telómero y eventualmente interrumpen la proliferación celular. Estas observaciones son evidencia de que el mantenimiento del tamaño de los telómeros juega un papel importante en regular el periodo de vida de las células.

Para determinar el tamaño de los telómeros se empleó el método TRF (Fragmentación de restricción del telómero), este método tiene la desventaja de que determina en forma general el tamaño del telómero sin saber en qué cromosoma y en qué célula se está midiendo el telómero, sin embargo, es el único método empleado en la actualidad.

Se esperaba que el tamaño del telómero fuera mayor en el tejido neoplásico, paradójicamente se encontró que los telómeros de tejido no neoplásico eran de mayor tamaño de los de tejido neoplásico.

Sin embargo se encontró diferencia de tamaño entre las dos pacientes, siendo de mayor tamaño el telómero de la paciente de menos edad que de la de mayor edad. Tabla 2

Las razones por las que pueden dar este tipo de resultados es que, aunque el mantenimiento del telómero es un parámetro crítico que permite la inmortalización celular, evidencias recientes sugieren que las células tienen que pasar por dos eventos importantes para lograr la inmortalización. El primer evento es, la senescencia replicativa, un estado en el que no hay proliferación pero el metabolismo celular continúa. El segundo evento que ocurre es una crisis celular la cual se caracteriza por telómeros extremadamente cortos y posterior a esto la célula se dirige hacia apoptosis. Sin embargo, se ha visto que pRB y p53 se encuentra mutado, en el 70% de las neoplasias, lo que condiciona que no existan puntos de control que hagan que la célula se dirija hacia apoptosis por lo que se hace inmortal.

Otra explicación para este resultado es que el estadio en el que se detectó la neoplasia era temprano y aún no se activaba la telomerasa para mantener los telómeros.

CONCLUSIONES

Los telómeros juegan un papel crítico en promover la transformación maligna; el desgaste telomérico en células humanas postsenescentes eventualmente inician una crisis, la cual se acompaña de fusión de cromosomas, funcionando como evidencia que incrementa la inestabilidad genómica. Una consecuencia de estos cambios en la estructura genómica es la activación de la telomerasa, la cual facilita la inmortalización. Sin embargo, este aumento de inestabilidad genómica causada por el acortamiento de los telómeros y la pérdida de la función protectora de estas estructuras conduce a la transformación neoplásica en ciertas condiciones.

Estas observaciones confirman que el mantenimiento del tamaño del telómero juega un papel complejo en el desarrollo del cáncer. La pérdida del telómero limita la proliferación celular y sirve como mecanismo de tumor supresor. Sin embargo, la pérdida suficiente del tamaño del telómero eventualmente permite el desorden genómico que conduce a la formación de tumor a través de la activación de la telomerasa y a través de la generación de otras mutaciones necesarias para la progresión del tumor.

En este caso solo se pudo medir el tamaño en dos pacientes por lo que sería interesante aumentar el tamaño de la muestra y medir la actividad de la telomerasa, ya que su actividad se correlaciona con un incremento del potencial maligno y el estadio.

Para entender el papel de los telómeros y la telomerasa en la fisiopatología del cáncer es necesario implementar estrategias dirigidas contra el mantenimiento de los telómeros y la actividad de la telomerasa ya que tiene implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Dentro de las implicaciones diagnósticas se ha reportado que si la actividad de la telomerasa aparece en los primeros estadios del cáncer, puede ser empleado para valorar el pronóstico y la terapia a seguir.

Además de los inhibidores específicos contra los sitios activos de la telomerasa, varios grupos de investigación han reportados otras medidas que inhiben la telomerasa que puede tener utilidad clínica. Una manera de inhibir la telomerasa es bloqueando su acceso al telómero para evitar que se siga manteniendo.

Estos hallazgos fundamentales hacen factible el hecho de que la telomerasa y el tamaño del telómero pueden ser usados como marcadores diagnósticos y pronósticos.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA. (Anexo 1)

Posterior al estudio trans-operatorio que confirmó el diagnóstico de cáncer de mama intraductal se obtuvo tejido fresco, el cual fue trasladado en un contenedor con nitrógeno líquido y se almacenó en un ultra congelador a -70°C , en el laboratorio de Genética Molecular de la U.I.M. Genética humana del hospital de Pediatría CMNSXXI.

Un fragmento del tejido se fijó en formol amortiguado, el cual sirve para confirmar el diagnóstico histopatológico por el Departamento de Anatomía Patológica del hospital de Oncología y HGZ1A, utilizando los criterios del comité Americano en cáncer (43).

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS (Anexo 2)

Nombre _____

Edad _____

Sexo: _____

Ocupación: _____

Antecedentes personales no patológicos: _____

Antecedentes personales patológicos: _____

Ubicación de la neoplasia por cuadrante:

EXTRACCIÓN DE DNA (Anexo 3)

El DNA de la muestra tumoral se obtuvo por el método descrito por Wright (44). El tejido congelado se trituró en un mortero, en presencia de nitrógeno líquido. El polvo obtenido se incubó con una solución de digestión con proteinasa K durante 12-18 hrs a 50°C. Se realizaron extracciones fenólicas del producto de la digestión y el DNA se precipitó con acetato de amonio y se resuspendió en agua des-ionizada.

Se verificaron las concentraciones e integridad de las muestras de DNA, mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa (45).

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL TELÓMERO POR FRAGMENTACIÓN DE RESTRICCIÓN DEL TELÓMERO (TRF). (Anexo 4)

El tamaño de los telómeros se determinó mediante el ensayo TRF descrito por Bryan (46)

El DNA genómico se cortó con 80 U de la enzima de restricción Hinf I (New England BioLabs). Los productos de la restricción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon. La membrana se hibridó con una sonda marcada con oligos al azar con digoxigenina. La sonda se detectó por inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina. La reacción de hibridación se visualizó por quimioluminiscencia utilizando como sustrato CSPD, en una placa autoradiográfica (DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II, Roche).

El tamaño del telómero se determinó en la autoradiografía utilizando el marcador de peso molecular λ DNA/ Hind III (New England BioLabs).

Anexo 5.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

HOSPITAL DE PEDIATRÍA

UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA.

FECHA: _____

Me han sido explicados claramente los objetivos del estudio realizado por la Dra. Fátima Sierra Pineda, los cuales no representan ningún riesgo para mi salud. Por lo cual acepto formar parte del proyecto de investigación de "Determinación del tamaño del telómero en cáncer de mama de mujeres mexicanas".

NOMBRE DE LA PACIENTE: _____ FIRMA:

NOMBRE DEL FAMILIAR: _____ FIRMA: _____

PARENTESCO: _____

BIBLIOGRAFÍA.

1. Secretaría de Salud. Tumores. Perfiles estadísticos No. 7. Series Monográficas. México, 1991.
2. Secretaría de Salud. Epidemiología. Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 1994.
3. Greenwood M. de la antigua a la Nueva epidemiología. En: Buck C, A Llopis A, Najera E y Terris M. El Desafío de la Epidemiología. Organización Panamericana de Salud. Washington D.C. 1988. 115-125.
4. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Salud. Daños a la Salud. Boletín de Información Estadísticas No. 12, 1992.
5. Daly JM, Bertagnolli M, DeCosse JJ. Oncología. En: Principios de Cirugía. Schwartz, Shieres, Spencer. 7ª. Edición. McGraw-Hill, 2000: 325-395.
6. Kinzler KW, Vogelstein B. Introduction to Cancer Genetics Chapters. En: Scriver, Beaudet, Valle, Sly. 8a Edición, USA. McGraw-Hill, 2001:521-524.
7. Bland KI, Vezeridis MP, Copeland EM. Cáncer de Mama. En: Schwartz, Shieres, Spencer. 7a. Edición. McGraw-Hill, 2000:581-650.
8. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao Y, Ferlay J, Powell J. Cancer incidents in Five Continents. Volume VI. International Agency for research on Cancer (WHO). Scientific Publications 120. Lyon 1992.
9. Secretaría de Salud. Registro histopatológico de neoplasias en México. 1977.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

10. Cárdenas SJ. Consenso nacional sobre tratamiento del cáncer mamario. *Rev Ins Nac Cancerología*, 1995; 41:136-145.
11. Instituto Mexicano del Seguro Social. Atlas Epidemiológico 1985-1990. México.
12. Boletín Estadístico Anual de Mortalidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Mortalidad General por causas agrupadas según magnitud. 1996.
13. Cornels CJ, Kuipers-Dijkshoorn N, Van Vliet M, Herman, Devilee P. Fractional allelic imbalance in human breast cancer increases with tetraploidization and chromosome loss. *Int J Cancer*, 1992; 50:544-548.
14. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiplod cases with few chromosome changes. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990; 49:203-217.
15. Thompson AM, Morris RG, Wallace M, Wyllie AH, Steel CM, Center DC. Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *Br J Cancer*, 1993; 68:64-68.
16. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mendel N, Mirelman F, Heim S. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosome Cancer*, 1995; 12:173-185.
17. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Olsson H, Sigurdsson H. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer*, 1992; 51:687-691.

18. Varley JM, Swallow JE, Brammar W, Whittaker J, Walker RA. Alterations to either ErbB-2 (neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with postmortal prognosis. *Oncogene*, 1987; 1:423-430.
19. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. ErbB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene*, 1991; 5:137-140.
20. Feral PA, Liu Q, Shattuck-Widens D, Cochran C, Harshman K. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 1994; 266:120-122.
21. Collins N, McManus R, Wooster R, Mansions J, Seal S. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene*, 1995; 10:1673-1675.
22. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condic A. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*, 1996; 56:1298-1304.
23. Vorechovsky I, Lio L, Lindblom A, Negrini M, Webster AD. ATM mutations in cancer families. *Cancer Res*, 1996; 56: 4130-4133.
24. Brieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chrom Cancer*, 1995; 14:227-251.
25. Caligo MA, Polidoro L, Ghimenti C, Compani D, Cechetti D, Bevilacqua G. A region on the long arm of chromosome 16 is frequently deleted in metastatic node negative breast cancer. *Int J Oncol*, 1998; 13:177-182.
26. Huiping C, Eiriksdottir G, Sigurdsson A, Sigurgeirsdottir JR, Barkardottir RB. High frequency of LOH at chromosome 18q in human breast cancer: association with high s-phase fraction and low progesterone receptor content. *Anticancer Res*, 1998; 18:1031-1036.

27. Driouch K, Brifford M, Bieche I, Champeme MH, Liderau R. Location of several putative genes possibly involved in human breast cancer progression. *Cancer Res*, 1998; 58:2081-2086.
28. Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D. Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer*, 1998; 19:181-186.
29. Phelan CM, Borg A, Cuny M, Crichton DN, Balderson T. Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Res*, 1998; 58:1004-1002.
30. Pardue ML, De Baryshe G. Telomeres in Cell Function: Cancer and Aging. *Cancer Res*, 1999; 96:3166-3170.
31. Lundbald V, Wright W. Telomeres and telomerase: a simple picture become complex. *Cell*, 1996; 87:369-375
32. Hahn WC. Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of human Cancer. *J Clin Oncol*, 2003; 21:2034-2043.
33. Blackburn EH. University of California, San Francisco, California, USA. Telomeres. *Encyclopedia of life Sciences*. 2001. Nature Publishing. 1-7.
34. Urquidi V, Tarin D, Gooddison S. Role of Telomerase in Cell senescence and Oncogenesis. *Ann Rev Med*, 2000; 51: 65-79.
35. De Lange T: Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 2002; 21:532-540.
36. Van Tinsel B, De Lange T: Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 1997; 385: 740-743.

37. Stansel RM, De Lange T, Griffith JD: T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J*, 2001; 20:5532-5540.
38. Zhu XD, Kuster B, Mann M: Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telómeros. *Nat Genet*, 2000; 25:347-352.
39. Kim N, Piatyszek M, Prouse R, Harley C, West M, Ho P, Coviello G, Wright W, Weinrich S, Shay J. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266:2011-2014.
40. Lange T: Activation of Telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91:2882-2885.
41. Ahmed A, Tollefsbol, Trygve : Telomeres, Telomerase and Telomerase inhibition: Clinical implications for Cancer. *Am Geriat Soc*, 2003; 51:116-122.
42. Wong JMY, Collins K: Telomere maintenance and disease. *Lancet*, 2003; 362:983-988
43. Cotran R, Kumar V, Robbins S, Schoen F (Eds). *Pathologic basis of disease*, 1994; 5a. Edición. Saunders.
44. Wright D, Manos M. Sample preparation from paraffin embedded tissues. En: *PCR Protocols: A single to methods and applications*. Editado por Innis M, Gelfand M, Sninsky J, White T. Academic Press, 1990: 153-158.
45. Sambrook B, Frits E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbord, 1989.
46. Bryan T, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, redde R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 1995; 14:4220-4248.
47. Hahn WC. Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer. *J Clinical Oncol*, 2003; 21:2034-2043.