

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

**Expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres
mexicanas sanas y con Cáncer mamario en diferentes estadios.**

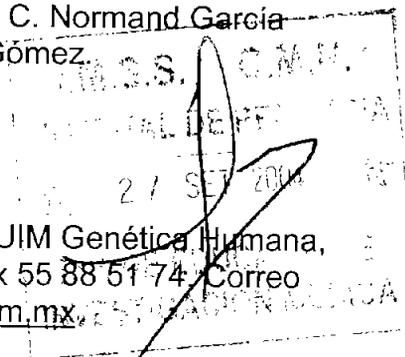
TESIS

Como uno de los requisitos para obtener el grado de
Especialista en Genética Médica

PRESENTA

Dra. Eunice López Muñoz

Tutores de la tesis: Dr. Diego Julio Arenas Aranda, M en C. Normand García
Hernández y Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez.



Dirección de la tesista: Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana,
CMN SXXI, IMSS. Teléfono 56 27 69 41, 56 27 69 45, Fax 55 88 51 74. Correo
Electrónico: astridkaryme2001@yahoo.com.mx.

México, Distrito Federal.

Septiembre 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.

DEDICATORIAS.

A mis padres Facundo y Lucila por su apoyo y estímulo en cada uno de los diferentes aspectos de mi vida para lograr cada una de mis aspiraciones.

A Amilcar, el amigo, el esposo, el confidente, el compañero de mi vida, quien motiva día a día mis acciones.

A Astrid Karyme, mi pequeña, quien con su sonrisa ilumina mi existencia.

Lugar de realización del proyecto:

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMN S-XXI, IMSS.

El presente trabajo fue apoyado por:

- El CONACYT a través del proyecto titulado “Estudio de genes, regiones cromosómicas y análisis de variación de proteínas en Cáncer de mama de mujeres mexicanas”, con la tutoría del Dr. Diego Julio Arenas Aranda. Con clave del proyecto número C01- 74 del fondo sectorial de salud CONACYT-IMSS.

100-100000

Unice Lopez, Florida

29-C9-C41
~~Example 13~~

INDICE	Página
Resumen	8
Antecedentes científicos	11
Generalidades	11
Aspectos clínicos de Cáncer de mama	12
Epidemiología	12
Factores de riesgo	12
Programas de detección	13
Ciclo celular	14
Apoptosis	15
Proteínas BCL-2	16
Gen BIK	18
Planteamiento del problema	19
Justificación	20
Objetivos	20
Hipótesis	20
Material y Métodos	21
Procedimiento de extracción de RNA total a partir de sangre periférica	23
Integridad de RNA en geles de agarosa	24
Cuantificación de RNA	25
Diseño de oligonucleótidos	25
Transcripción reversa	27
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
Determinación de expresión génica a través de geles de agarosa	29
Resultados	30
Discusión y Conclusiones	42
Anexo 1: Carta de consentimiento informado	46
Bibliografía	48

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Diagrama de flujo	22
Tabla 1A Características de las mujeres donadoras de muestra sanguínea	30
Tabla 1B Características de las mujeres donadoras de muestra sanguínea	31
Figura 2 RNA total	31
Tabla 2 Características del RNA total de las muestras	33
Tabla 3 Características del RNA total de controles positivos y negativos	34
Figura 3 Gradiente de concentración de Cloruro de Magnesio, gen BIK	35
Figura 4 Gradiente de concentración de Cloruro de Magnesio, gen HPRT	36
Figura 5 Gradiente de temperatura	37
Figura 8 Productos de amplificación de las muestras 1 a 19	38
Figura 7 Productos de amplificación de muestras 20 a 28 y T1 a T10	39
Figura 8 Productos de amplificación de muestra T11 y controles	40
Figura 9 Productos de amplificación de la muestra T1 y controles	41

RESUMEN

Título: Expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres mexicanas sanas y con Cáncer mamario en diferentes estadios.

Antecedentes:

El Cáncer mamario en nuestro país ocupa el segundo lugar con un 16.4% como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años de edad.

Se han identificado numerosos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario, entre estos dos genes de mayor susceptibilidad para Cáncer hereditario BCRA1 y BCRA2; y para Cáncer esporádico entre ellos P53, ATM, C-MYC Y ERBB2.

Por lo tanto es importante el estudio de los mecanismos involucrados en la proliferación y progresión del ciclo celular, ya que están funcionalmente ligadas a la expresión de genes asociados con control de crecimiento. Cuando hay alteraciones importantes en el material genético la célula puede elegir apoptosis como medio para evitar la acumulación de mutaciones.

La apoptosis es una vía de muerte celular activa, metabólica y genéticamente codificada. Esta ocurre bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Los mecanismos regulatorios del ciclo celular, incluyendo la apoptosis están comprometidos en células tumorales. Dentro de los mecanismos reguladores de la apoptosis se encuentra la familia de genes BCL-2, algunos miembros son pro-apoptóticos, mientras que otros son anti-apoptóticos. Una proteína pro-apoptótica es Bik/Nbk y su acción en el proceso de carcinogénesis no es bien conocida.

Se han efectuado estudios para determinar en qué tejidos se expresa BIK, encontrándose en células epiteliales de tejido tumoral mamario y nula expresión en linfocitos de sangre periférica.

Pregunta de investigación, objetivos e hipótesis.

¿Hay diferencias de expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres sanas mexicanas con respecto a mujeres con cáncer de mama en diferentes estadios?

Objetivo: Determinar la expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres sanas mexicanas así como mujeres con Cáncer de mama en diferentes estadios.

Hipótesis: La expresión del gen BIK difiere significativamente en células sanguíneas de mujeres sanas y de mujeres con cáncer de mama en diferentes estadios.

Material y métodos.

Se trató de un estudio observacional, transversal, que incluyó 28 pacientes sanas y como 11 pacientes con Cáncer de mama para determinar la expresión del gen BIK en sangre periférica.

Las mujeres sanas fueron valoradas a través de exploración física a fin de descartar la presencia de masas tumorales mamarias, además de que fueron mexicanas en por lo menos tres generaciones previas y no tenían antecedentes de Cáncer mamario familiar.

Las mujeres con Cáncer mamario tenían estadificación clínica así como estudio mamográfico, no estaban en tratamiento y eran mexicanas en por lo menos tres generaciones previas (pacientes del Hospital de Oncología del CMN S XXI IMSS). Todas las mujeres participantes firmaron carta de consentimiento informado que se anexa al presente.

Se efectuó aislamiento de RNA a través del paquete comercial RNeasy® a partir de 4 mL de sangre periférica, se comprobó la integridad de éste a través de geles de agarosa así como cuantificación por espectrofotometría. Posteriormente se efectuó RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen BIK y gen HPRT

(gen control). Se analizaron las diferencias de expresión a través de geles de agarosa.

Experiencia del grupo de investigación

En nuestra Unidad de Investigación se encontró que para el caso de análisis de células tumorales en diversos estadios, principalmente en estadios III y IV de cáncer de mama se encuentra sobre expresado el gen BIK.

Dados estos antecedentes en este trabajo se determinó la expresión del gen BIK tanto en mujeres sanas mexicanas como en mujeres con cáncer de mama en todos sus estadios, a fin de determinar si hay correlación entre la expresión del gen BIK en células de sangre periférica y metástasis. En caso de metástasis se encontraría expresión del gen en sangre periférica dada la invasión de células tumorales al torrente sanguíneo.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.

Generalidades.

El Cáncer mamario en nuestro país ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años de edad. Es heterogéneo en su presentación clínica, genética y bioquímica. La gran mayoría de mujeres afectadas presentan una masa mamaria o anomalía en el estudio mamográfico como la única manifestación clínica de la enfermedad, lo que lleva a que aproximadamente 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer mamario lleguen a encontrarse en estadios avanzados. (1,2)

Se han identificado numerosos factores de riesgo para el desarrollo de Cáncer mamario. La historia familiar sugiere un componente hereditario en el desarrollo de algunos Cánceres de mama y ha sido considerada como uno de los mayores factores de riesgo conocidos. Se estima que 15 a 20% de mujeres con Cáncer mamario tienen una historia familiar de la enfermedad. (3)

Se han identificado dos genes de mayor susceptibilidad para Cáncer mamario hereditario, BRCA1 y BRCA2. El gen BRCA1 es altamente penetrante, ubicado en el cromosoma 17q21 y se encuentra alterado en aproximadamente 20 a 30% de los Cánceres mamarios hereditarios. Las familias con mutaciones en línea germinal en BRCA1 tienen un patrón de herencia autosómico dominante de Cáncer de mama así como un incremento en la incidencia de Cáncer ovárico. La mutación en BRCA1 está bien definida.

BRCA2 es un gen altamente penetrante, ubicado en el cromosoma 13q12-13 y se encuentra mutado entre el 10 a 20% de los Cánceres mamarios hereditarios. Las familias con mutaciones en línea germinal en BRCA2 también tienen un patrón de herencia autosómico dominante y una menor incidencia en la frecuencia de Cáncer ovárico en comparación con las mutaciones en el gen BRCA1 en donde la incidencia de Cáncer ovárico es mayor. La mutación en el gen BRCA2 también está bien definida. (4, 5, 6, 7)

La mayor parte de Cáncer mamario, sin embargo corresponde a Cáncer esporádico en donde se ha demostrado alteración en factores de crecimiento y

sus receptores, moléculas de señalamiento intracelular, moléculas de adhesión celular, reguladores de ciclo celular y proteasas. (7)

ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER DE MAMA.

Epidemiología.

En nuestro país el Cáncer de mama ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad en mujeres mayores de 35 años. Esta neoplasia ha presentado en nuestro país una tendencia al aumento en la mortalidad ya que en el año de 1991 se reportó una tasa de mortalidad de 10.6 por 100,000 habitantes en derechohabientes del IMSS y de 11.2 por 100,000 habitantes en no derechohabientes del IMSS, mientras que en el año 2001 la tasa de mortalidad por Cáncer de mama para derechohabientes del IMSS fue de 11 por 100,000 habitantes y en no derechohabientes del IMSS fue de 16.8 por cada 100,000 habitantes. (1,2)

Factores de riesgo.

Se han efectuado múltiples estudios a fin de identificar factores de riesgo potencialmente modificables en el estilo de vida y factores ambientales íntimamente relacionados con la presencia de Cáncer mamario, sin embargo, el riesgo más significativo identificado es la historia familiar de Cáncer mamario. Así las mujeres cuyas madres o hermanas tuvieron Cáncer de mama tienen una probabilidad 3 ó 4 veces mayor que otras de desarrollar la enfermedad. El riesgo se incrementa en aquellas mujeres cuyas madres o hermanas tuvieron Cáncer antes de la menopausia o fue bilateral, y en aquellas con antecedentes familiares de Cáncer mamario en dos o más parientes en primer grado. Sin embargo, no hay antecedentes de Cáncer de mama en cerca del 90% de las pacientes con este cáncer.

Hay cierta evidencia de que la administración de estrógenos en mujeres posmenopáusicas puede ocasionar un ligero aumento del riesgo, pero solo con dosis altas y por un tiempo prolongado. Otros estudios sugieren que sólo las mujeres con una historia familiar de cáncer mamario que toman estrógenos en la posmenopausia, o las que toman estradiol o estrógenos no conjugados, aumentan ligeramente su riesgo de Cáncer de mama. (8,9)

Programas de detección

Se han realizado varios programas de detección de masas consistentes en exámenes físicos y mamográficos de mujeres asintomáticas. Estos procedimientos han logrado identificar aproximadamente cerca de 10 Cánceres por 1000 mujeres mayores de 50 años y cerca de dos Cánceres por 1000 mujeres menores de 50 años de edad. Casi el 80% de estas mujeres tiene ganglios linfáticos axilares negativos al momento de la cirugía, mientras que se encontró que en la práctica médica ordinaria solo 45% tiene ganglios axilares no afectados. La detección del Cáncer mamario antes de que se haya propagado hacia los ganglios axilares aumenta notablemente la probabilidad de supervivencia y cerca del 85% de esas mujeres sobrevivirá cuando menos cinco años.

Tanto el examen físico como la mamografía resultan necesarios para lograr resultados máximos en los programas de detección, ya que solo 35-50% de los Cánceres mamarios tempranos pueden descubrirse sólo mediante mamografía y otro 40% puede detectarse únicamente por palpación. Cerca de la tercera parte de las anormalidades descubiertas en las mamografías de detección se encontraron malignos cuando se efectuó la biopsia.

La sensibilidad de la mamografía varía aproximadamente 54-58% en mujeres de 40 años y de 81-94 años en mujeres de 65 años de edad. Esta sensibilidad depende de varios factores, incluyendo la edad de la paciente, densidad de la mama, tamaño del tumor, localización y aspecto mamográfico. En mujeres jóvenes con mamas densas, la mamografía tiene menor sensibilidad que en aquellas con mayor edad con mamas con gran tejido graso, en las cuales la mamografía puede detectar cuando menos 90% de las malignidades. Los tumores más pequeños, particularmente los que no tienen calcificaciones, son más difíciles de detectar, particularmente en mamas densas. La falta de sensibilidad en mujeres jóvenes ha conducido a cuestionamientos en cuanto al valor de la mamografía para los estudios de detección en mujeres de 40 a 50 años. La especificidad de la mamografía en las mujeres menores de 50 años varía desde casi 30 a 40%, para las anormalidades mamográficas no palpables, hasta 85-90% para las malignidades clínicamente evidentes.

Existen dudas en cuanto al efecto benéfico de someter a pruebas de detección a mujeres menores de 50 años, aunque el *"Health Insurance Plan Project"* mostró efecto benéfico en las pruebas de detección de esas mujeres, con reducción de 25% en la mortalidad por cáncer entre 10 y 18 años después de ingresar al estudio. El efecto benéfico del programa de detección en mujeres de 50 a 69 años de edad fue indiscutible y ha sido confirmado por las experiencias clínicas. (10)

La determinación de la etapa clínica se basa en el grado de la enfermedad, evidente por los datos físicos y estudios preoperatorios especiales. En la actualidad, el *"American Joint Committee on Cancer"* y la *"International Union Against Cancer"* han estado de acuerdo en un sistema de clasificación TNM (Tumor, Ganglios Linfáticos regionales y Metástasis) para el Cáncer mamario.

Una vez que se diagnostica y se estatifica, el tratamiento está dirigido hacia lograr dos metas importantes:

- 1) Control local del tumor en la mama y en los nódulos axilares ipsilaterales
- 2) Erradicación de micro metástasis ocultas sistémicamente. El control local puede ser obtenido en la mayoría de los casos por mastectomía únicamente o por la remoción de tumor con márgenes tumorales histológicamente negativos, seguido por radiación en la mama afectada. (10,11)

CICLO CELULAR.

La proliferación y progresión del ciclo celular están funcionalmente ligadas a la expresión de genes asociados al control de crecimiento.

La integración de señales regulatorias de crecimiento tanto negativas como positivas, está involucrada en:

- 1) Repetición del ciclo celular para la división de células en estadios tempranos de la embriogénesis y continua renovación de poblaciones de células madre.
- 2) Estimulación de células quiescentes para proliferar en remodelamiento tisular y reparación de heridas.
- 3) Salida del ciclo celular con la opción de proliferar o diferenciarse.

La transcripción y síntesis proteica son necesarias para la replicación del DNA y la división mitótica. Se han identificado puntos de restricción que determinan el paso a través de las fases del ciclo celular. Los mecanismos de regulación del ciclo celular están comprometidos en células tumorales. Posterior a la exposición a radiación o agentes carcinógenos, la célula puede continuar su proliferación, detener el crecimiento o dirigir la célula a apoptosis; estas decisiones las debe tomar la célula en puntos de restricción localizados en la fase S y M del ciclo celular.

En fase S hay revisión de material genético, de histonas y de la fidelidad de ensamblamiento de cromatina. En mitosis la revisión de condensación cromosómica, ensamblamiento de aparato mitótico, alineamiento cromosómico, movimiento cromosómico y citocinesis.

En cuanto al control de la proliferación, hay varios ciclos interdependientes funcionalmente ligados:

- 1) Parámetros bioquímicos y moleculares que sostienen la replicación del genoma y división mitótica.
- 2) Cascada de factores reguladores asociados a ciclinas que transducen señales mediadas por factores de crecimiento que son fosforilados, controlando así la expresión de genes responsables de iniciación de proliferación y competencia de la célula para la progresión del ciclo.

Cuando hay alteraciones importantes en el material genético la célula puede elegir apoptosis como medio para evitar la acumulación de mutaciones. (12, 13, 14)

APOPTOSIS

La apoptosis es una vía de muerte celular activa, metabólica y genéticamente codificada. Esta ocurre bajo condiciones fisiológicas o patológicas. La apoptosis es un proceso biológico fundamental implicado en el desarrollo temprano así como organogénesis de organismos multicelulares. Ejerce un papel opuesto a la mitosis en el mantenimiento de las poblaciones celulares. La muerte celular también tiene que ver con el proceso dinámico de remodelamiento de tejidos y respuesta al

estrés. La apoptosis es un mecanismo de protección que dirige la lisis de células infectadas por virus, células extrañas o neoplasia incipiente. La pérdida de la regulación de apoptosis está involucrada en Cáncer.

Existen numerosos factores ambientales que pueden activar la apoptosis y otros factores que pueden antagonizar la apoptosis. Los activadores de la apoptosis incluyen el factor de necrosis tumoral alfa, ligando Fas, factor de crecimiento transformante beta, BAX y otros miembros de la familia de genes pro-apoptóticos BCL-2 así como glucocorticoides. Además, la aberrante expresión oncogénica, por ejemplo de C-MYC, o función de genes tumor supresor normal como P-53 puede producir apoptosis bajo condiciones específicas. (15, 16, 17, 18)

PROTEINAS BCL-2

BCL-2 y ciertas proteínas citoplasmáticas son elementos reguladores de apoptosis. Los organismos multicelulares eliminan células redundantes, dañadas o infectadas por un programa de suicidio celular denominado apoptosis. La alteración de la apoptosis puede contribuir al Cáncer y enfermedades degenerativas y autoinmunes.

BCL-2, fue detectado como parte de una translocación cromosómica en linfoma folicular humano y a partir de su análisis se estableció que permite la supervivencia de células hematopoyéticas dependientes de citocinas. BCL-2 está íntimamente relacionado con las proteínas CED3 que son parte de una familia de proteasas conocidas como caspasas, quienes tienen activación secuencial y rompen o dañan a ciertas proteínas blanco, para iniciar el desmantelamiento celular en la apoptosis.

Se han identificado al menos 15 miembros de la familia BCL-2 en mamíferos. Todos los miembros poseen al menos uno de cuatro motivos conocidos como dominios de homología a BCL-2 denominados BH1 a BH4. La mayoría de los miembros antiapoptóticos que pueden inhibir la apoptosis contienen al menos BH1 y BH2 mientras que otros contienen los 4 dominios.

BCL-2 despliega la propiedad inusual de extender la supervivencia celular más que promover la proliferación celular. Las regiones denominadas BH1, BH2, BH3 son requeridas para las interacciones proteína-proteína de importancia de la regulación de apoptosis. BCL-2 es capaz de dimerizar con un número de factores relacionados los cuales a través de su dominio BH comprenden la familia de factores reguladores de apoptosis. Aunque sus mecanismos de acción no son bien conocidos, algunos miembros de la familia BCL-2 actualmente se sabe que promueven la apoptosis mientras que otros la antagonizan.

La expresión de BCL-2 es ubicua durante la embriogénesis pero llega a estar más restringida en tejidos adultos en donde se asocia con larga supervivencia tales como células madre y células de zonas en proliferación. La sobre expresión de BCL-2 es capaz de antagonizar la apoptosis inducida por C-MYC o P-53. Sin embargo, BCL-2 antagoniza la apoptosis sin afectar la función mitogénica de C-MYC y sin revertir el arresto de crecimiento por P53 indicando que BCL-2 actúa corriente debajo de C-MYC y P 53.

BCL-X es miembro de la familia de BCL-2 y funciona para regular la muerte celular. Los transcritos BCL-X son alternativamente empalmados en dos productos: BCL-XL y BCL-XS. BCL-XL actúa inhibiendo la apoptosis similar a BCL-2, mientras que BCL-XS antagoniza las acciones de BCL-2 y BCL-XL y es un proapoptótico. BAX es otro miembro proapoptótico de la familia BCL-2. Este y otros miembros de BCL-2 proapoptóticos pueden actuar con patrones de heterodímeros con BCL-2 y BCL-XL y contraponerse a la actividad de la protección de la muerte celular.

Varios de los miembros de la familia BCL-2 tienen conexión con otros factores reguladores corriente arriba de los reguladores de la apoptosis. La expresión BAX ha sido mostrado que es regulado transcripcionalmente por P-53 en ciertos contextos. Otros miembros pro-apoptóticos de la familia BCL-2 son BAD y BIK.

(19)

GEN BIK.

El gen humano BIK codifica una proteína de 160 aminoácidos con función proapoptótica denominada BIK. La proteína BIK cuenta con un dominio funcional denominado BH3 y contiene un dominio transmembranal c-terminal. (20) Se ha localizado este gen en 22q13.3, consta de cinco exones y cuatro intrones y se extiende cerca de 19 Kb. El dominio transduccional y el dominio BH3 fueron localizados en el exon 2 y 3 respectivamente. BIK tiene fuerte actividad apoptótica en un gran número de tipos celulares *in vitro*. El dominio BH3 juega un papel central en inducir la muerte celular y dimerización proteica. (21)

Peter T. y colaboradores (22) realizaron estudios en donde se mostró que el gen BIK tiene una distribución de expresión restringida, siendo mayormente detectada en células epiteliales. En su estudio se demostraron altos niveles de expresión del tejido en riñón y páncreas y niveles bajos en placenta, pulmón, hígado, próstata y testículos. Mientras que no se encontró la presencia del gen en corazón, cerebro, músculo esquelético, bazo, timo, ovario, intestino delgado, colón y linfocitos de sangre periférica.

Se demostró que el mRNA esta expresado ectópicamente en algunas líneas celulares de tumores, por ejemplo fue detectado en células EBV (Virus de Epstein Barr) positivas tipo III de Linfoma de Burkitt y SW480 de adenocarcinoma de colón. La expresión del gen fue detectada en epitelio pero no en el compartimiento linfoide. Dadas las propiedades pro-apoptóticas de BIK, éste debería estar involucrado en el mantenimiento de la homeostasis tejido específico en tejidos del adulto. (20, 21, 22)

En un estudio realizado en nuestra unidad de investigación se encontró que en el análisis de células tumorales en diversos estadios, principalmente en estadios III y IV de cáncer de mama se encuentra sobre expresado el gen BIK y dada la nula expresión de BIK en linfocitos de sangre periférica sería de esperarse que en caso de presencia de células tumorales en torrente sanguíneo se encontrara expresión del gen en sangre periférica. (23)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Cáncer mamario constituye un problema de salud pública en todo el mundo, sin embargo, aun no se conocen en su totalidad los mecanismos etiopatogénicos involucrados en su presentación, por lo que dada la relación de mecanismos tanto apoptóticos como anti-apoptóticos en la génesis del Cáncer y en este caso de Cáncer mamario es de sumo interés determinar si la expresión del gen BIK puede constituir un marcador detectable en sangre de Cáncer de mama.

Pregunta de investigación:

¿Hay diferencias de expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres sanas mexicanas con respecto a mujeres con Cáncer de mama en diferentes estadios?

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

Hasta el momento no se han efectuado estudios a fin de confirmar la nula expresión del gen BIK en células de sangre periférica, por lo que se efectuó dicha determinación.

Se ha descrito la presencia del gen BIK en tejido mamario con Cáncer en estadios avanzados, sin embargo, no se ha descrito su expresión en células sanguíneas de mujeres con Cáncer mamario. De no encontrarse su expresión en células sanguíneas de mujeres sanas pero si en mujeres con Cáncer de mama podría contribuir a la detección de mujeres con Cáncer de mama.

De encontrarlo en mujeres con Cáncer de mama en estadios terminales podría interpretarse como marcador de metástasis tumoral. Dada la importancia del estudio, este a futuro podría ampliarse a un mayor número de muestra a fin de determinar su utilidad como método auxiliar en el diagnóstico de Cáncer de mama

OBJETIVOS.

Determinar si el gen BIK se encuentra expresado en células sanguíneas de mujeres sanas

Determinar si el gen BIK se encuentra expresado en células sanguíneas de mujeres con Cáncer mamario en sus diferentes estadios.

HIPÓTESIS.

La expresión del gen BIK difiere significativamente en células sanguíneas de mujeres sanas y de mujeres con Cáncer de mama en diferentes estadios.

MATERIAL Y METODOS.

Diseño experimental.

Se trata de un estudio transversal y observacional.

Población de estudio.

Criterios de Inclusión.

I. Grupo de Mujeres Sanas.

Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres sanas de 20-60 años de edad, mexicanas por lo menos en tres generaciones previas, se realizó exploración física a todas las mujeres del grupo de estudio a fin de descartar la presencia de masas tumorales.

II. Grupo de Mujeres con Cáncer mamario.

Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres de 25-90 años de edad con Cáncer mamario (Independiente del tipo histológico), mexicanas en por lo menos tres generaciones previas, con diagnóstico así como estadificación clínica, sin tratamiento al momento de la toma de la muestra.

Todas firmaron la hoja de consentimiento informado.

Criterios de no inclusión.

Mujeres a quienes no se les realizó exploración física.

Mujeres en quienes no se realizó diagnóstico de certeza.

Mujeres que se encontraban en tratamiento.

Criterios de exclusión.

Mujeres que no firmaron hoja de consentimiento informado.

Mujeres que abandonaron voluntariamente el estudio.

Las muestras se obtuvieron para el caso de las mujeres sanas en forma aleatoria y para el caso de mujeres con Cáncer del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS (colaboración del Dr. Sinuhé Barroso Bravo, Cirujano Oncólogo, Jefe de Servicio de la Consulta externa de Cáncer de mama).

El protocolo fue aprobado por el comité de investigación y el comité de bioética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

METODOLOGÍA.

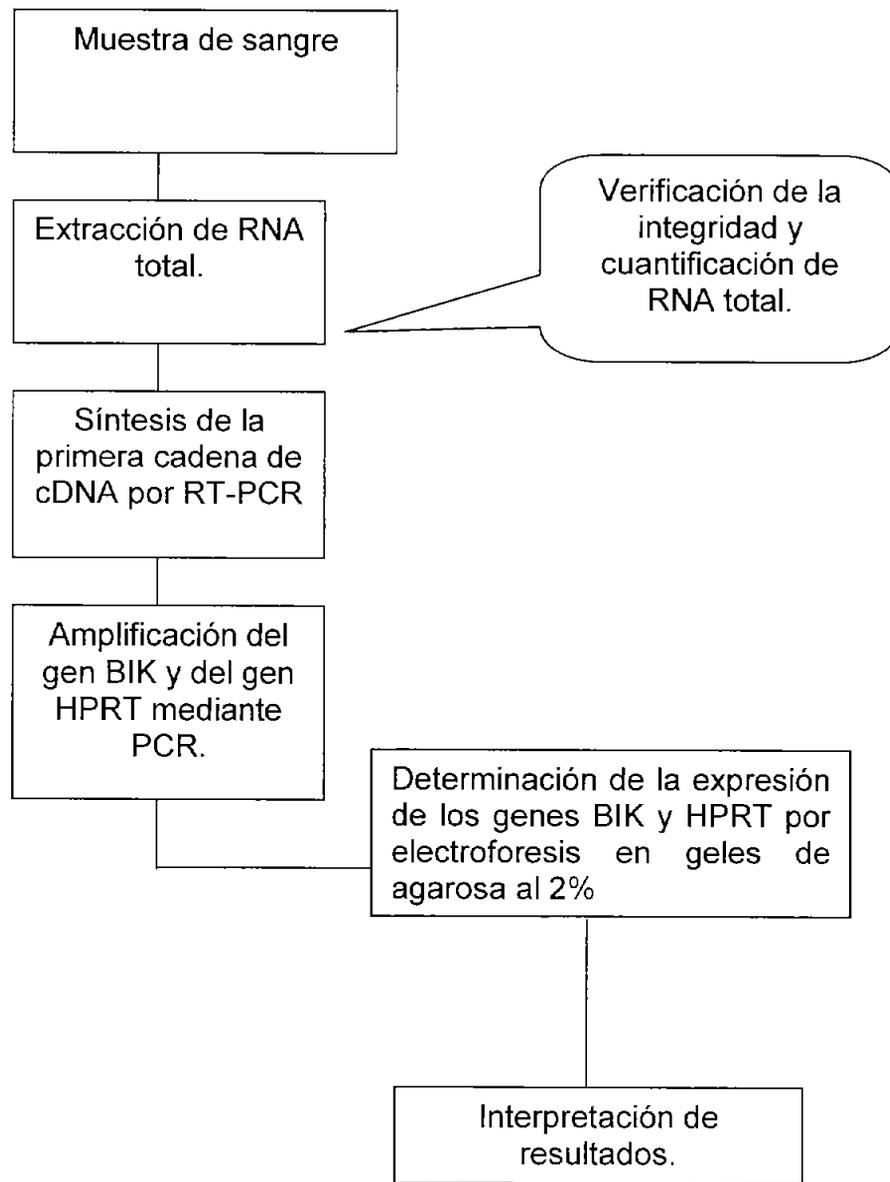


Figura 1.- Diagrama de flujo. Esquematiza el orden de los procedimientos metodológicos para el desarrollo del trabajo.

EXTRACCIÓN Y COLECCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA.

1. A través de punción en vena periférica se obtuvieron 4 mL de sangre.
2. Se colocaron inmediatamente en tubos BD Vacutainer™ K₃ EDTA de 5 mL.
3. Se homogenizó la sangre con el EDTA.
4. Se mantuvieron en hielo hasta el momento de efectuar el aislamiento del RNA total, mismo que se realizó en menos de una hora después de la extracción de sangre.

EXTRACCION DE RNA TOTAL.

1. Se colocó 3mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences®) en tubo de ensayo de cristal de 13 x 100 mm nuevo.
2. Se agregó 2 mL de sangre periférica en la parte superior del Ficoll-Paque, evitando que se mezclaran.
3. Se centrifugó por 25 minutos a 1 500 rpm (Centrifuga clínica Solbat®, modelo J-12).
4. Con pipeta Pasteur se recolectaron las células blancas y se colocaron en tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm (Centrifuga Eppendorf®, modelo 54150).
6. Se retiró el sobrenadante.
7. De acuerdo al manual del paquete comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®) para aislamiento de RNA total, se agregó 350µL de amortiguador RLT previamente preparado con β-Mercaptoetanol (β-ME) a una dilución de 10 µL β-ME por 1 mL de amortiguador RLT.
8. Se agitó con vortex por 3- 4 minutos (Vortex-Genie®, modelo K-550-G).
9. Se agregó un volumen de 350 µL de etanol al 70% y se homogenizó.
10. Se transfirió el contenido del tubo (700µL) a la columna RNeasy mini.
11. Se centrifugó 15 segundos a 12,000 rpm y se quitó el líquido del tubo de recolección transparente.
12. Se adicionó un volumen de 700 µL de RW1 a la columna y se centrifugó 15 segundos a 12,000 rpm.
13. Se desechó el tubo de colección con el líquido recolectado.

14. Se colocó la columna en otro tubo de colecta de 2 mL nuevo y se agregó 500 μ L de RPE a la columna.
15. Se centrifugó 15 segundos a 12,000 rpm.
16. Se desechó el líquido.
17. Se agregó nuevamente 500 μ L de RPE a la columna y se centrifugó dos minutos a 12,000 rpm.
18. Se desechó el tubo de colección y se colocó la columna en un tubo nuevo y se centrifugó un minuto a 12,000 rpm para eliminar residuos de RPE.
19. Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 30 μ L de agua libre de RNasa en la membrana blanca y se cerró el tubo. Se centrifugó un minuto a 12,000 rpm.
20. Se almacenó a -30 °C, hasta su uso.

ELABORACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA CONFIRMAR INTEGRIDAD DE RNA TOTAL.

Se colocó 50 mL de TBE 1X y 1 g de agarosa grado molecular, se fundió la agarosa a aproximadamente 50°C. Se agregó 8 μ L de bromuro de etidio (concentración 1 μ g/mL) y se homogenizó. Se vació en la cámara de electroforesis, se dejó polimerizar. Se agregó amortiguador TBE hasta que se cubrieran ligeramente los pozos. Se cargaron 2 μ L de muestra mezclada con 1 μ L de azul de bromofenilo (6X). Se separaron los ácidos nucleicos mediante 70 Volts durante 120 minutos.

Se visualizó el gel a través de transiluminador de luz ultravioleta (Mighty bright, Hoefer Scientific InsTM).

Secuencia del gen BIK.

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysclik) y sintetizados por Invitrogen™ life technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gen Bank, NCBI con el número u34584 y con una Tm de 55 °C para cada uno.

```
ORIGIN
      gagacatctt gattggagacc ggggaggggg gggggggggg gggggggggg GAGACATCTT
61 GATGGAGACC gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
101 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
151 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
201 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
251 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
301 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
351 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
401 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
451 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
501 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
551 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
601 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
651 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
701 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
751 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
801 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
851 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
901 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
951 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1000 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
```

En letras negras y mayúsculas se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento de 290 pb denominado MIMIC's ("Forward" 5' GAGACATCTT GATGGAGACC 3' y "Reverse" 5' ACATCAGGGA TGTTCTTAGA 3') y un fragmento de 366 pb denominado TARGET (Información no mostrada).

TRANSCRIPCION REVERSA

Se realizó la transcripción reversa a partir del RNA total extraído de células de sangre periférica. Se ajustó la cantidad de RNA total a 100 ng. Se utilizaron dos paquetes comerciales para la realización de la transcripción reversa.

I. ThermoScript™ RT-PCR System. (Invitrogen™ life technologies) para síntesis de cDNA mediante transcripción reversa. Con las siguientes especificaciones:

1. En un tubo de 0.2 mL se colocó:

COMPONENTE	VOLUMEN
Oligonucleótido (50µM Oligo (dT) ₂₀)	1µL
RNA (100ng)	xµL de acuerdo a la concentración
Mezcla de dNTP (10mM)	2µL
Agua DEPC	Ajustar a 12µL

2. Se desnaturalizó el RNA y el oligonucleótido por incubación a 65 °C en un termociclador (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®) durante cinco minutos y se colocó en hielo.
3. Se agitó en vortex el amortiguador de síntesis de cDNA 5X durante cinco segundos antes de usar.
4. Se preparó una mezcla maestra en hielo y se agitó en vortex gentilmente.

COMPONENTE	VOLUMEN
Amortiguador de síntesis de cDNA 5X	4µL
0.1 M DTT	1µL
RNaseOUT™	1µL
Agua DEPC	1µL
ThermoScript™ RT (15 unidades/µl)	1µL

5. Se agregó 8 µL de la mezcla maestra en cada tubo de reacción en hielo.
6. Se transfirió la muestra al termociclador precalentado a 50°C por 60 minutos (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®).
7. Se terminó la reacción por incubación a 85 °C por cinco minutos.
8. Se agregó 1µL de RNase H y se incubó a 37 °C por 25 minutos en el termociclador (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®).
9. Se almacenaron las reacciones de síntesis de cDNA a -30 °C hasta su uso.

II. SuperScript™ First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen™ life technologies) para síntesis de cDNA mediante transcripción reversa. Con las siguientes especificaciones:

1. Se mezcló y centrifugó brevemente cada componente antes de usar.
2. Se preparó una mezcla de RNA total/Iniciador en tubos estériles de 0.2 µL como sigue:

COMPONENTE	VOLUMEN
RNA (100ng)	xµL de acuerdo a la concentración
Mezcla de dNTP	1µL
Oligonucleótido (dT) ₁₂₋₁₈	1µL
Agua DEPC	Ajustar a 10µL

3. Se incubó cada muestra a 65 °C en un termociclador (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®) durante cinco minutos y se colocó en hielo.
4. Se preparó la siguiente mezcla de reacción, adicionando cada componente en el orden indicado.

COMPONENTE	VOLUMEN
Amortiguador de síntesis de cDNA 10X	2µL
25 mM MgCl ₂	4µL
DTT 0.1 M	2µL
RNaseOUT™	1µL

5. Se agregó 9 µL de la mezcla de reacción a cada mezcla de RNA total/oligonucleótido, se mezcló gentilmente y se centrifugó brevemente.
6. Se incubó a 42 °C durante dos minutos en un termociclador (RoboCycler, Gradient 40, Stratagene ®).
7. Se agregó 1µL (50 unidades) de SuperScript™ II “Reverse Transcriptase” a cada tubo y se incubó a 42 °C durante 50 minutos.
8. Se terminaron las reacciones a 70°C durante 15 minutos. Se colocaron en hielo.
9. Se centrifugaron las reacciones. Se agregó 1 µL de RNase H a cada tubo y se incubaron por 20 minutos a 37 °C antes de proceder al PCR. Se almacenaron a -30 °C.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizaron las reacciones de amplificación con los siguientes reactivos y cantidades estándar.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (ML)
Oligonucleótido (F y R)	20 pmol	1
Amortiguador 10X	1X	2
MgCl ₂	2.5 mM	2
DNTPs	2mM	2
Agua		11.8
Taq polimerasa	0.5 UI	.2
cDNA		1
Volumen final		20

La amplificación se efectuó en termociclador Gene Amp® PCR System 9700, con las siguientes pasos: la primera fase de desnaturalización inicial (94 °C durante 5 minutos), la segunda fase de 45 ciclos con tres pasos, el primero de desnaturalización (94 °C durante 20 segundos), el segundo de amplificación (T_m de cada oligonucleótido durante 1 minuto) y el tercero de elongación (72 °C durante 1 minuto) y la tercera fase de elongación final (72 °C durante 7 minutos).

DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN GENICA A TRAVES DE GELES DE AGAROSA.

Se colocó 50 mL de TBE 1X y 1 g de agarosa grado molecular, se fundió la agarosa aprox. 50°C. Se agregó 8µL de bromuro de etidio (concentración 1µg/mL) y se homogenizó. Se vació en la cámara de electroforesis, se dejó polimerizar. Se agregó amortiguador TBE hasta que se cubrieran ligeramente los pozos. Se cargaron 10 µL de muestra mezclada con 1 µL de azul de bromofenilo (6X). En uno de pozos se agregó marcador de peso molecular. Se separaron los ácidos nucleicos mediante 100 Volts durante 90 minutos. Se visualizó el gel con luz ultravioleta para evidenciar las bandas de los amplificados.

RESULTADOS

En la tabla 1A y 1B se muestra la lista de donadoras y sus características generales tales como talla, peso, índice de masa corporal total, estado civil, número de hijos, lactancia y uso de estrógenos. Para el caso de la tabla 1B además se especifica el estadio del tumor en la primera columna. Se obtuvo sangre periférica de 28 mujeres mexicanas no afectadas de 20-50 años de edad y de 11 mujeres mexicanas con Cáncer de mama esporádico de 25-90 años de edad, referidas del servicio de oncología del CMN, S-XXI, IMSS.

Tabla 1A.- Características de las mujeres donadoras de muestra sanguínea.

Mtra.	EDAD (años)	PESO (Kg.)	TALLA (m)	IMC (Kg/m ²)	EDO. CIVIL	HIJOS	LACTANCIA	ESTROGENOS
Donadoras no afectadas de Cáncer de mama								
1	26	64	1.7	22.14	CASADA	1	SI	SI
2	30	78	1.56	32.05	CASADA	1	SI	SI
3	46	60	1.57	24.34	SOLTERA	0	NO	NO
4	40	56.5	1.6	22.07	CASADA	2	SI	NO
5	35	67	1.59	26.50	SOLTERA	0	NO	NO
6	44	58	1.66	21.04	CASADA	3	SI	NO
7	24	70	1.56	28.76	SOLTERA	0	NO	SI
8	52	69	1.67	24.74	SOLTERA	0	NO	NO
9	28	54	1.68	19.13	SOLTERA	0	NO	NO
10	27	56.3	1.57	22.84	CASADA	1	SI	SI
11	32	57	1.56	23.42	SOLTERA	0	NO	NO
12	25	57	1.57	23.12	SOLTERA	0	NO	NO
13	25	70	1.6	27.34	SOLTERA	0	NO	NO
14	43	67	1.59	26.50	SOLTERA	0	NO	NO
15	23	67	1.67	24.02	SOLTERA	0	NO	NO
16	30	68	1.56	27.94	CASADA	0	NO	NO
17	44	56	1.64	20.82	SOLTERA	0	NO	NO
18	23	57	1.65	20.93	SOLTERA	0	NO	NO
19	25	58	1.7	20.06	SOLTERA	0	NO	NO
20	24	58	1.56	23.83	SOLTERA	0	NO	NO
21	43	70	1.59	27.68	SOLTERA	0	NO	NO
22	35	67	1.7	23.18	SOLTERA	0	NO	NO
23	36	66.8	1.65	24.53	CASADA	2	SI	NO
24	40	70	1.55	29.13	CASADA	2	SI	NO
25	37	68.5	1.55	28.51	SOLTERA	0	NO	NO
26	39	67	1.57	27.18	CASADA	0	NO	SI
27	34	66	1.6	25.78	CASADA	0	NO	SI
28	41	65	1.65	23.87	CASADA	0	NO	SI

Tabla 1B.- Características de las mujeres donadoras de muestra sanguínea

Mtra.	EDAD (años)	PESO (Kg.)	TALLA (m)	IMC kg/m	EDO. CIVIL	HIJOS	LACTANCIA	ESTROGENOS
Pacientes con Cáncer de mama								
T1, III	40	58	1.67	20.79	CASADA	2	SI	NO
T2, III	82	59.5	1.56	24.44	CASADA	2	SI	SI
T3, IIB	66	70	1.54	29.51	CASADA	5	SI	NO
T4, IIA	44	71	1.57	28.80	CASADA	3	SI	NO
T5, IB	69	68	1.6	26.56	CASADA	2	SI	NO
T6, IIIB	30	54	1.57	21.90	SOLTERA	0	NO	NO
T7, IB	68	56	1.67	20.07	CASADA	3	SI	NO
T8, IB	80	78	1.59	30.85	CASADA	4	SI	NO
T9, IV	70	67	1.6	26.17	CASADA	2	SI	NO
T10, IV	40	69	1.58	27.63	CASADA	3	SI	NO
T11, IB	52	55	1.59	21.75	CASADA	1	SI	NO

AISLAMIENTO DEL RNA.

Inicialmente se obtuvieron células blancas sanguíneas por el método Ficoll-Paque. Se obtuvieron aproximadamente 5,000 a 10,000 células por decilitro. A partir de estas células se obtuvo RNA total según se describe en métodos. El RNA total obtenido se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNA'asas. Se comprobó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa. Una alícuota de RNA total (2 µL) aproximadamente 20-100 ng se separó mediante electroforesis (según métodos). Una vez terminada la electroforesis el gel se observó a través de transiluminador de UV (Mighty bright, Hoefer Scientific Ins™). En la figura 2 se ejemplifica la integridad del RNA total de las muestras 1 a 8, se observan dos bandas brillantes del RNA ribosomal de mamíferos que corresponden a las subunidades 28s y 18s de aproximadamente 4.5 y 1.9 Kb.

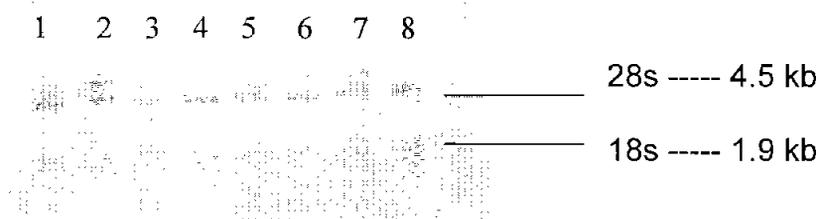


Figura 2.- RNA total. Se indican las bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s del RNA ribosomal, de las muestras 1 a 8. Ejemplificando la integridad del RNA total.

CUANTIFICACION DE RNA.

Una vez que se determino la integridad de las muestras, se procedió a la cuantificación mediante espectrofotometría (según métodos). En la tabla 2 se muestra la absorbancia del RNA de cada muestra a una longitud de onda de luz ultravioleta de 260 nm y 280 nm, así como la relación de pureza. Se considera una pureza adecuada en un rango de 1.9 a 2.1. También se especifica la concentración de RNA obtenida a partir de la absorbancia a 260 nm multiplicada por 2000 [por 40µg (equivalencia de una densidad óptica) por la dilución utilizada, que en este caso fue 1:50]. Una vez obtenida la concentración se ajustaron las cantidades de RNA para la transcripción reversa.

Tabla 2.-Características del RNA total. Expone 39 muestras y su concentración del RNA total y el volumen para obtener 100 ng

MUESTRA	°A 260	°A 280	RELACION DE PUREZA	CONC. [ng/μL]	VOLUMEN NECESARIO PARA 100 ng de RNA total para RT-PCR (μL)
1	0.083	0.041	2.02	166	1
2	0.103	0.05	4	206	1
3	0.032	0.015	1.3	64	3
4	0.049	0.024	2	98	2
5	0.049	0.022	2	98	2
6	0.043	0.022	1.7	86	2
7	0.042	0.021	1.7	84	2
8	0.1	0.058	4	200	1
9	0.063	0.031	2.03	126	2
10	0.137	0.052	2.08	274	1
11	0.044	0.022	1.88	88	2
12	0.006	0.003	2	2	9
13	0.008	0.004	2	2	9
14	0.009	0.006	1.5	1.5	9
15	0.013	0.07	1.85	26	7
16	0.125	0.036	3.47	250	1
17	0.017	0.009	1.88	34	5
18	0.178	0.061	2.91	356	1
19	0.03	0.016	1.87	60	3
20	0.023	0.014	1.76	46	4
21	0.008	0.005	1.6	16	9
22	0.011	0.007	1.57	22	7
23	0.006	0.004	1.5	12	9
24	0.021	0.011	1.9	42	4
25	0.006	0.003	1.5	12	9
26	0.008	0.004	2	16	9
27	0.009	0.006	1.5	18	9
28	0.008	0.004	2	16	9
T1	0.016	0.01	1.6	32	5
T2	0.018	0.012	1.5	36	5
T3	0.025	0.015	1.66	50	3
T4	0.013	0.005	2.6	26	7
T5	0.018	0.009	2	36	5
T6	0.013	0.005	2.6	26	7
T7	0.017	0.01	1.7	34	6
T8	0.01	0.004	2.5	20	8
T9	0.008	0.003	2.66	16	9
T10	0.016	0.007	2.28	32	5
T11	0.018	0.009	2	36	5

TRANSCRIPCION REVERSA.

Se realizó transcripción reversa a partir del RNA total como se describe en métodos para obtener cDNA de todos los transcritos expresados con cola poly-A en las células de las 39 muestras de sangre periférica, así como de cuatro muestras de RNA total aislado previamente en el laboratorio que fueron utilizados como controles positivos (Tumor de mama y Tumor renal) y negativos (MCF-7 y RNA Comercial). En la tabla 3 se describen algunas de las características generales de los controles positivos y negativos. Se utilizó un microlitro de cada una de estas muestras para cada reacción.

Tabla 3. Características del RNA total de controles positivos y negativos. Describe las características generales de cada uno de ellos.

MUESTRA	CARACTERISTICAS
RNA total de MCF-7	La línea celular MCF7 es derivada de epitelio diferenciado mamario. La línea celular fue obtenida de una mujer caucásica de 69 años de edad. (ATCC The Global Bioresource Center™, Núm. HT-22). La concentración de RNA fue de 1.0 µg/µL.
RNA total de tejido mamario no afectado.	Mezcla de RNA total de tejido mamario de tres mujeres no afectadas por Cáncer, mayores de 35 años de edad. (Clontech®). La concentración de RNA fue de 0.9 µg/µL.
RNA total de tumor mamario	Obtenido de mujer de 40 años de edad, con Cáncer de mama, estadio tumoral IIB. La concentración del RNA fue de 1.3 µg/µL.
RNA total de tumor renal	Obtenido de tejido de nefroblastoma de un niño de 3 años de edad. La concentración de RNA fue de 0.8 µg/µL.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

A partir del cDNA obtenido mediante la transcripción reversa de las 43 muestras, se desarrolló ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según métodos para amplificar los genes HPRT y BIK. Se incluyeron controles negativos a los que en lugar de cDNA se les agregó agua DEPC.

Utilizando cDNA de tejido tumoral mamario se realizó la estandarización de la PCR a través de un gradiente de Cloruro de Magnesio para determinar la concentración adecuada, y un gradiente de temperatura para amplificar óptimamente los productos de los genes HPRT y BIK. En la figura 3 se observa el

gradiente de Cloruro de Magnesio que va de 0.5 a 2.5 mM encontrándose que la amplificación se efectuó en mayor cantidad a una concentración de 1.5 mM para el caso del gen BIK. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos específicos del gen BIK. Uno de ellos que produce un fragmento de 366 pb (denominado TARGET) y el otro que produce un fragmento de 290 pb (denominado MIMIC's). Se utilizó un marcador de peso molecular de 123 pb. 0.5 a 2.5

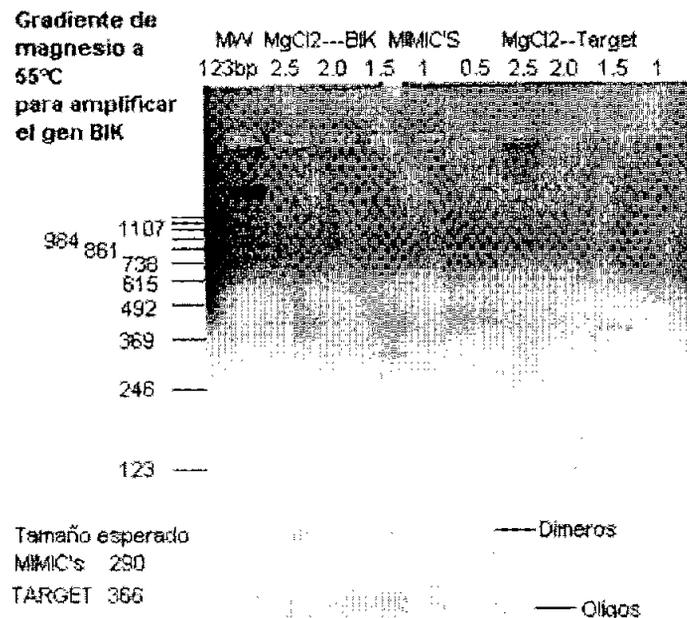


Figura 3. Gradiente de concentración de Cloruro de Magnesio. Se muestran bandas obtenidas al amplificar el gen BIK con un tamaño esperado de 366 pb (MIMIC's) y de 290 pb (TARGET). En el carril uno se muestra el marcador de peso molecular (123pb). Se indican en la parte superior las diferentes concentraciones utilizadas.

En la figura 4 se observa el gradiente de Cloruro Magnesio que va de 1.0 a 2.5 mM encontrándose que la amplificación se efectuó en la concentración de 2.5 mM para el gen HPRT que produce un fragmento de 387 pb. Se utilizó un marcador de peso molecular de 123 pb.

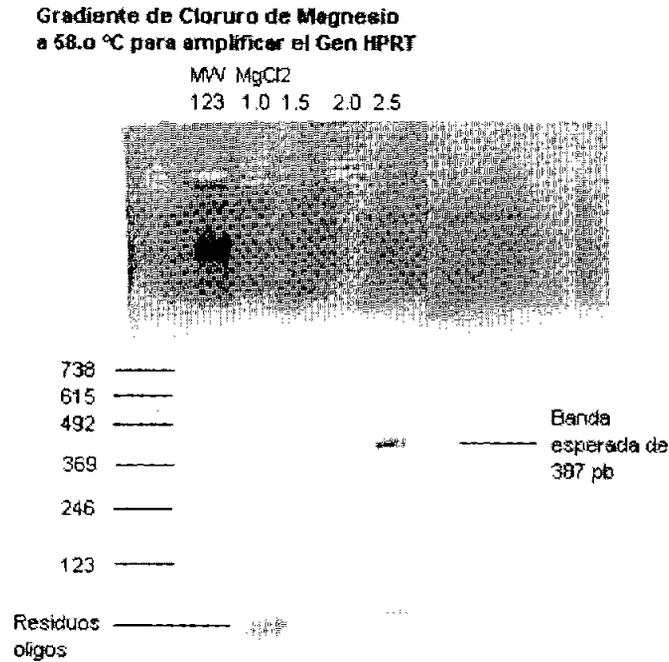


Figura 4. Gradiente de concentración de Cloruro de Magnesio. Se muestran bandas obtenidas al amplificar el gen HPRT con un tamaño esperado de 387 pb. En el carril uno se muestra el marcador de peso molecular (123pb). Se indican en la parte superior las diferentes concentraciones utilizadas.

En la figura 5 se observa el gradiente de temperatura (53 a 56 °C) con diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio para el gen BIK que amplifica un fragmento de 290 pb utilizando el par de oligonucleótidos MIMIC's y de 366 pb utilizando el par de oligonucleótidos TARGET. Se muestra un marcador de peso molecular de 123 pb en el primer carril. Para el gen HPRT se desarrolló un gradiente de temperatura (53 a 58 °C) con una concentración de 2.5 mM de Cloruro de Magnesio (Información no mostrada).

Gradiente de temperatura de MIMIC'S y TARGET

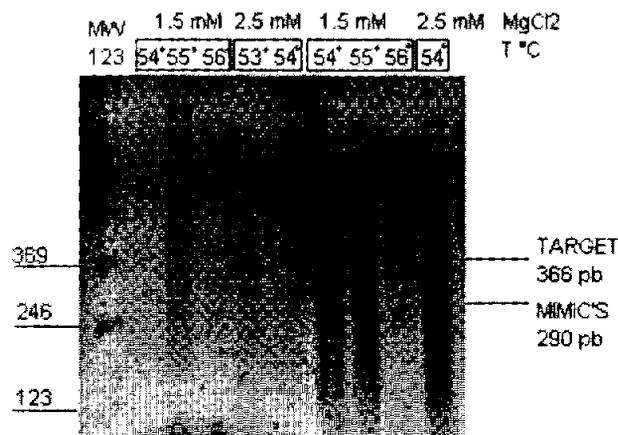


Figura 5. Gradiente de temperatura. Se muestran las bandas obtenidas al amplificar el gen BIK produciendo un fragmento de 290 pb para MIMIC's y un fragmento de 366 pb para TARGET. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular (123pb). Se indican en la parte superior las diferentes temperaturas y concentraciones de Cloruro de Magnesio utilizadas.

VERIFICACION DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACION MEDIANTE GELES DE AGAROSA.

Una vez determinadas las condiciones ideales para realizar la PCR se realizó la amplificación de los fragmentos de los genes HPRT (T_m 58.0 °C y 2.5 mM de $MgCl_2$) y BIK (T_m 55.0 °C y 1.5 mM de $MgCl_2$) utilizando un micro litro de cDNA de cada una de las muestras y controles (Descrito en métodos).

Se realizaron geles de agarosa al 2% como se describe en métodos, con la finalidad de separar los productos de amplificación. Se cargaron alícuotas de 10 μ L.

en los pozos, en forma alterna colocando primero el producto de amplificación del gen HPRT (H) seguido del producto de amplificación del gen BIK (B). En la porción central se colocó el marcador de peso molecular de 123 pb. A continuación se describen las figuras de los geles de agarosa.

En la figura 6 se observan los productos de amplificación correspondientes a las muestras 1 a 19. Se observa expresión del gen HPRT con un fragmento de 387 pb para todas las muestras. Se observa ausencia de expresión para el gen Bik en las muestras 1 a 19.

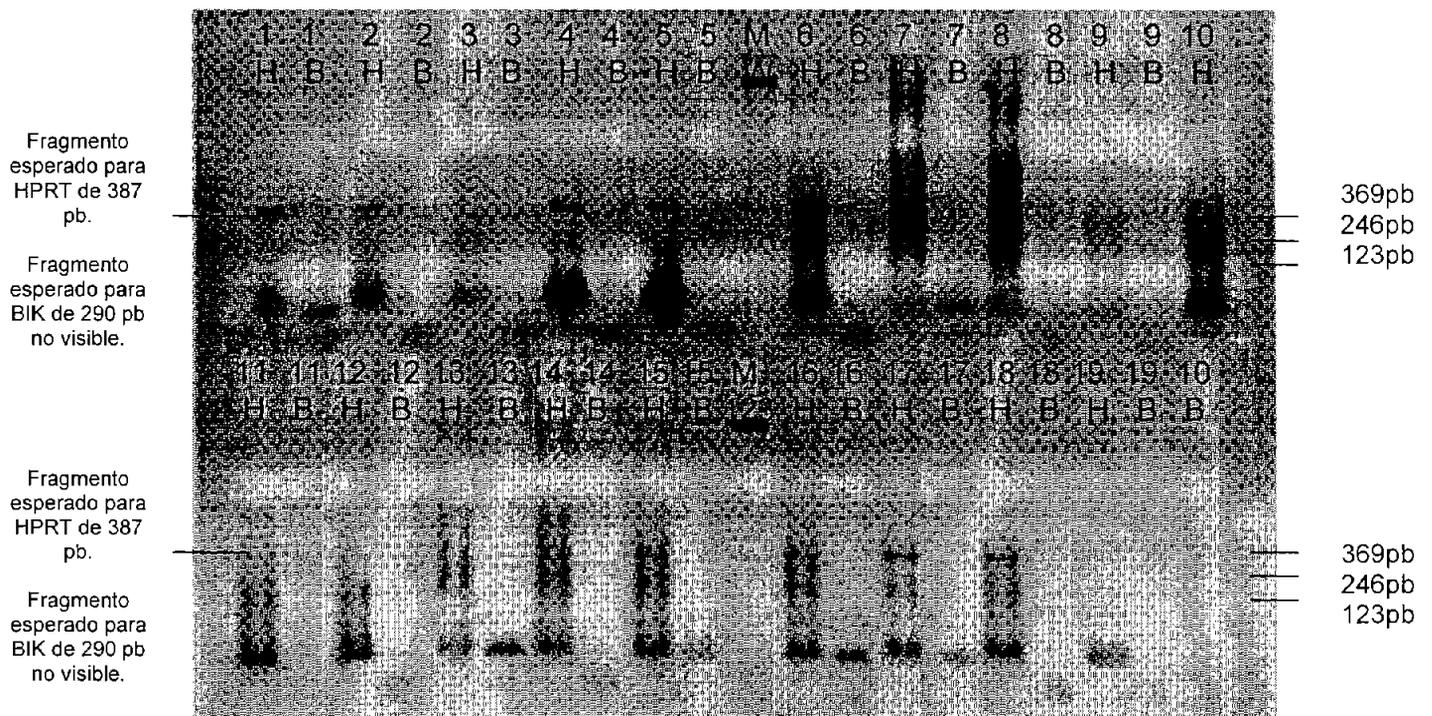


Figura 6. Productos de amplificación mediante PCR. Se muestra la amplificación de HPRT 387 pb (H) y Bik 290pb (B) para las muestras 1 a 19. En carriles centrales el marcador molecular.

En la figura 7 se observan los productos de amplificación correspondientes a las muestras 20 a 28 y T1 a T10 del gen HPRT con un fragmento de 387 pb. Se observa ausencia de expresión para el gen Bik en las muestras 20 a 28 y T2 a T10.

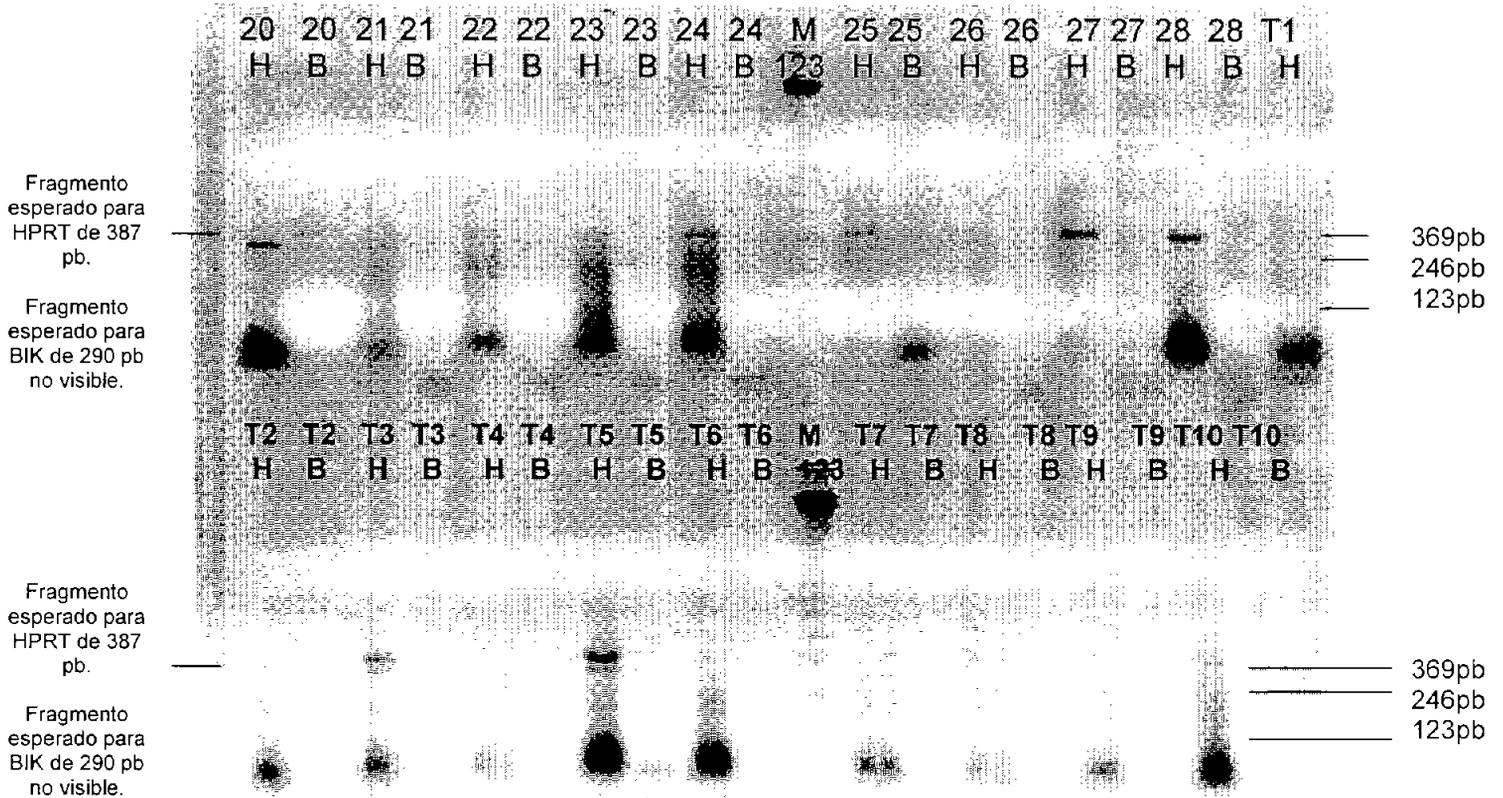


Figura 7. Productos de amplificación mediante PCR. Se muestra la amplificación de HPRT con un fragmento de 387 pb (H) para las muestras 20 a 28 y T1 a T10. Y ausencia de Bik con un fragmento esperado de 290pb (B). En carriles centrales el marcador molecular (123pb).

En la figura 8 se observan los productos de amplificación del gen HPRT para la muestra T11, así como para MCF-7 (L), tumor renal (R), comercial (NA) y tumor de mama (Ca). Para el caso del gen BIK no se observa amplificación en el caso de la muestra T11 y para los controles negativos L y NA. No hay amplificación de los genes HPRT y BIK en ninguno de los controles negativos (N).

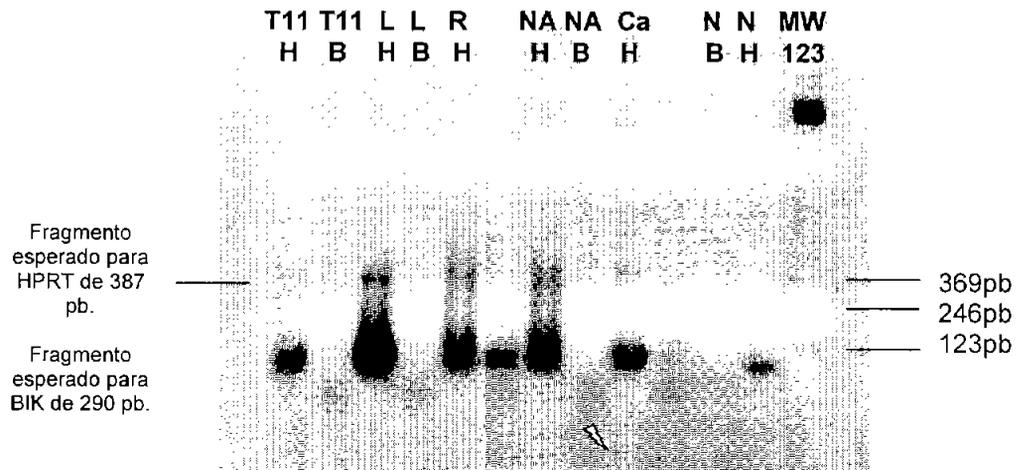


Figura 8. Productos de amplificación mediante PCR. Se muestra la amplificación de HPRT con un fragmento de 387 pb (H) para las muestras (T11, L, R, NA y Ca) y agua (N). Y el gen BIK con un fragmento esperado de 290 pb para la muestra T11 y para los controles negativos (L, NA y N). En ultimo carril el marcador molecular (123pb).

En la figura 9 se observa el producto de amplificación de BIK en la muestra de sangre periférica de un paciente (T1) con Cáncer de mama; así como de la muestra procedente de tumor de riñón (R) y de tumor de mama (Ca). Se observa ausencia de producto de amplificación para el control negativo el cual no contiene cDNA.

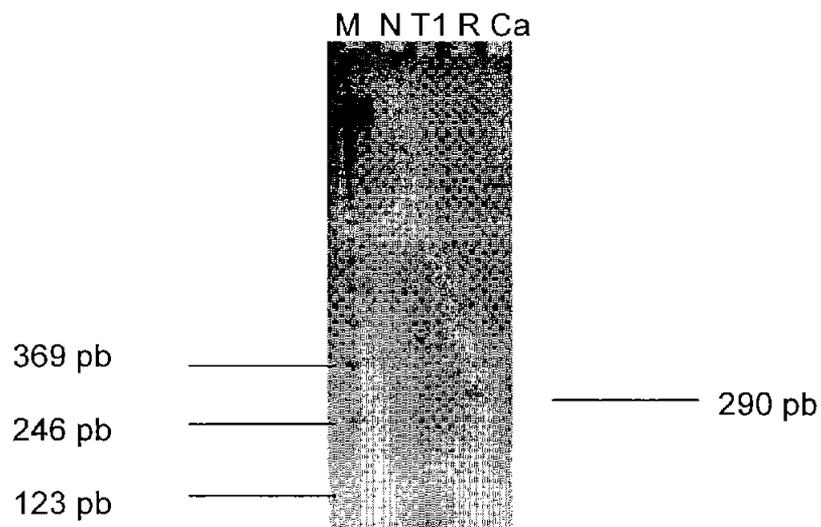


Figura 9. Productos de amplificación mediante PCR. Se muestra la amplificación de BIK con un fragmento de 290 pb para la muestra T1 y para los controles positivos (R y Ca) y control negativo (N). En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 123 pb.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los cambios moleculares asociados a Cáncer de mama esporádico han sido estudiados ampliamente. Se ha demostrado la alteración de factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de señalización intracelular, reguladores de ciclo celular, moléculas de adhesión y proteasas en el Cáncer de mama esporádico (10).

Desde la secuenciación del genoma humano se han realizados ensayos masivos para evaluar y conocer la función de muchos genes. Actualmente se esta trabajando en comprender la información e instrucciones contenidas en los genes para hacer funcionar el cuerpo humano y para descubrir la cura de enfermedades como el Cáncer, en cuyo origen participan una gran cantidad de genes en una red de interacciones particulares y complejas. La identificación de genes implicados en el avance de la enfermedad puede permitir un mayor entendimiento del origen de la neoplasia a nivel molecular. Un análisis sistemático de la expresión génica durante las diferentes etapas del Cáncer mamario es necesario para entender los mecanismos de avance e invasión de la neoplasia.

En nuestra unidad de investigación se realizó con anterioridad un estudio para determinar los perfiles de expresión génica en neoplasia mamaria mediante micro arreglos de cDNA donde se reportó para el caso de los tumores en estadio IIA la pérdida de expresión de genes relacionados con los sistemas de reparación y respuesta a daño celular, apoptosis y supresores tumorales. También se encontró sobreexpresión de genes relacionados con crecimiento, regulación de ciclo celular y oncogenes. En el caso de los tumores en estadio IIB y III se encontraron alteraciones en un mayor número de genes. Se encontró que en etapas mas avanzadas del Cáncer mamario había alteraciones como sobreexpresión de genes relacionados con angiogénesis, degradación de la matriz extracelular, proliferación, interacción célula-célula o subexpresión de genes relacionados con adhesión, diferenciación y apoptosis. Para el caso del gen BIK se encontró sobre expresión en 13 de 14 muestras en estadios IIB y III. Debido a la función

proapoptótica reportada para el gen BIK, su expresión en estas muestras sugiere: 1) su participación en la apoptosis de células neoplásicas con múltiples alteraciones, 2) que el producto proteico del gen pudiera no ser funcional por no tener modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación (23) ó 3) una función diferente a la proapoptótica, en la progresión e invasión de las células neoplásicas.

Peter y colaboradores (22) determinaron la expresión del gen BIK en diferentes tejidos del cuerpo humano encontrando nula expresión del gen en células de sangre periférica. Dado que no se había realizado un estudio confirmatorio de este hallazgo, realizamos la búsqueda de la expresión del gen en 28 muestras de sangre periférica de mujeres mexicanas sanas de 20-50 años de edad. Se descartó la presencia de masas mamarias en cada una de ellas por medio de exploración física. Se efectuaron determinaciones de peso, talla e índice de masa corporal total además de preguntas a fin de conocer antecedentes como el uso de estrógenos, lactancia, número de hijos y estado civil para conocer las características generales de cada una de las donadoras y así, en caso de encontrar diferencias de expresión de BIK conocer las variables que pudieran afectar la interpretación de los resultados (ver tabla 1A y 1B).

Por otro lado, debido a que en nuestra unidad de investigación el gen BIK se encontró sobreexpresado en la mayor parte de los tumores de mama en estadios avanzados (23), justo cuando las células neoplásicas tienden a invadir tejido adyacente, ganglionar o torrente sanguíneo, decidimos determinar la expresión del gen en células de sangre periférica en mujeres con Cáncer de mama en diferentes estadios.

Las pacientes tenían diagnóstico y estadificación del tumor. Las muestras fueron difíciles de obtener debido a que las pacientes deberían cumplir con los criterios de selección referidos en el diseño del estudio y la mayoría de las pacientes ya se encontraban en tratamiento. No se lograron obtener muestras de mujeres con

tumores en estadio IA esto debido a que en su mayor parte, el diagnóstico temprano de Cáncer de mama es realizado cuando el tumor se encuentra en estadio IB. Solo se obtuvieron 10 pacientes con Cáncer de mama sin tratamiento y 1 paciente con Cáncer de mama en quien ya se había iniciado el tratamiento con quimioterapia.

Con las 28 muestras sanguíneas de mujeres sin Cáncer de mama y con las 11 muestras de mujeres con Cáncer de mama se realizó aislamiento de RNA total a partir de células blancas, se verificó la integridad de éste en geles de agarosa (ver figura 2) y se cuantificó por espectrofotometría para conocer su concentración y determinar el volumen necesario para realizar la transcripción reversa (ver tabla 2). Se realizó transcripción reversa del RNA total obtenido de las muestras sanguíneas así como del RNA total utilizado como control (ver tabla 3). La transcripción reversa fue realizada con dos paquetes comerciales a fin de evaluar un mejor desempeño, no encontrando diferencias por lo que se utilizaron indistintamente. Con el cDNA obtenido de la muestra de Tumor mamario se realizaron ensayos de amplificación para estandarizar las condiciones de PCR, desarrollándose gradientes de Cloruro de Magnesio y de Temperatura con cada uno de los oligonucleótidos específicos de los genes HPRT y BIK (ver figuras 3, 4 y 5). Con los gradientes se determinó la T_m del gen BIK que correspondía a 55 °C y la concentración de Cloruro de Magnesio a 1.5 mM, mientras que para HPRT la T_m fue de 58 °C y la concentración de Cloruro de Magnesio de 2.5 mM.

Para el caso del gen BIK se realizaron pruebas de amplificación de cDNA con dos pares de oligonucleótidos denominados TARGET y MIMIC's. Por los resultados obtenidos, para la amplificación final de BIK se utilizó el par de oligonucleótidos denominado MIMIC's ya que en el caso de TARGET se observaba una banda de amplificación que no correspondía al tamaño del fragmento esperado. En el caso del MIMIC's se observó el fragmento del tamaño esperado y aun cuando se puede llegar a observar otras bandas que pueden ser debidas a una contaminación de DNA no afectan el estudio (ver figura 5).

Se observó que todas las muestras amplificaron el gen HPRT, excepto en el que contenía agua, mientras que únicamente se observó la expresión del gen BIK en la muestra tumoral mamaria, en la tumoral renal [datos previamente reportados por García H. (23) y Peter y cols. (22)], y en la muestra sanguínea procedente del caso número uno (T1) de una paciente con Cáncer de mama, la cual se encontraba en tratamiento quimioterapéutico. La expresión del gen BIK en esta paciente puede explicarse debido a que el gen tiene función pro-apoptótica y al estar bajo quimioterapia el índice de apoptosis y expresión de genes relacionados con ésta, se eleva. El uso del gen HPRT como control nos permitió comprobar la adecuada calidad del RNA total, ya que se observó su expresión en todas las muestras. No se observó la amplificación del gen BIK en el caso de las muestras de sangre periférica y controles negativos (ver figuras 6, 7 y 8). La funcionalidad correcta de los oligonucleótidos específicos del gen BIK también se comprobó al observar su amplificación en los controles positivos (ver figura 9).

En vista de que no se observó la expresión del gen BIK en las muestras procedentes de mujeres sin Cáncer, podemos confirmar el hallazgo reportado por Peter y colaboradores (22) y aunque tampoco se pudo evidenciar la expresión del gen BIK en las 10 mujeres con Cáncer de mama, se plantea que el estudio debe extenderse en mayor número de mujeres con Cáncer de mama y/o la posibilidad de realizar un ensayo más fino como el RT-PCR en tiempo real, una de las técnicas moleculares más sensibles a fin de determinar si hay expresión del gen BIK en sangre periférica de mujeres con Cáncer de mama en diferentes estadios, evidenciando la presencia de células metastásicas mamarias. La identificación de marcadores asociados a metástasis es una necesidad en esta patología debido al incremento de la mortalidad en nuestro país.

Ya que el Cáncer es resultado de alteraciones en un gran número de genes, es necesario analizar con mayor profundidad el comportamiento de estos y las posibles asociaciones encontradas en el desarrollo de las neoplasias.



ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Consentimiento informado para el protocolo: ***“Expresión del gen BIK en células sanguíneas de mujeres mexicanas sanas y con Cáncer mamario en diferentes estadios”.***

1. Información sobre el estudio.

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación. El estudio de investigación involucra a personas sanas a sí como a personas afectadas con Cáncer de mama en diferentes estadios. El Cáncer de mama es una entidad que en nuestro país ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años de edad con un 16.4%. La gran mayoría de mujeres afectadas presentan una masa mamaria o anomalía en estudio mamográfico de rutina como la única manifestación clínica de la enfermedad, lo que lleva a que aproximadamente 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer mamario lleguen a encontrarse ya con enfermedad metastásica, la cuál es fatal.

Por este conducto se le solicita su consentimiento informado para realizar la búsqueda de expresión de un gen denominado BIK en sangre periférica que servirá como probable marcador de metástasis para cáncer de mama.

2. Procedimiento.

Se tomarán 5 mL de sangre periférica del paciente siempre y cuando reúnan los criterios de inclusión establecidos previamente y solo si desean participar de manera libre en este protocolo de investigación. Al término del estudio, el investigador proporcionará la información completa sobre los resultados.

3. Beneficios.

El estudio en búsqueda de la expresión del gen BIK en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama podría constituir una herramienta diagnóstica para aquellos pacientes con cáncer de mama.

4. Confidencialidad.

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito.

5. Participación / suspensión.

La participación de usted en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Su decisión de rehusarse a participar o suspender el estudio no afectará la calidad ni disponibilidad de la atención médica.

6. Consentimiento.

La Dra. Eunice López Muñoz, residente del tercer año de la especialidad en Genética Médica se ha encargado de explicarle los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que este implica. Usted ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tiene alguna duda deberá comunicarse con los responsables del estudio.

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

BIBLIOGRAFÍA.

1. Certificados de defunción. Sistema de mortalidad (SISMOR) y base de mortalidad (INEGI).
2. IMSS (1996) Boletín Estadístico Anual de Mortalidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Mortalidad General por Causas agrupadas según magnitud.
3. Berry D, Parmigiani G, Sánchez J, Schildkraut J & Winer E (1997). Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *J Nat Can Inst* 97: 227-238.
4. Welch P. & King M. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Nature Reviews* 10: 705-713.
5. Folias A. Et-al. (2002). BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Human Molecular Genetics*, 11:2591-2597.
6. Witt E. & Ashworth. (2002). D-Day for BRCA2. *Science* 297: 534.
7. Biechel & Lidereau R (1995) Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chrom Cancer*. 14:227-251.
8. Broet P et-al. (1995) Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol*. 13: 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: 1713-1727.
10. Vogelstein B. et-al (1998) Breast Cancer. Mc Graw Hill. Chapter 30: 537-550)
11. Bryony s & Werb Z (2002) Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science*. 296:1046-1049.
12. William C. Hahn and Robert A. Weinberg (2002). Modelling the molecular circuitry of Cancer. *Nature Reviews* 2: 331-341.
13. Allione F. Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H & Birnbaum D (1998) Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer*. 19:181-186.
14. Bertram J (2001) The molecular biology of cancer. *Mol. Asp Med* 21: 167-223.
15. Malumbres M. & Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews*. 1: 222-231.
16. Mathon N. & Lloyd A. (2001). Cell Senescence and cancer. 1: 203-211.
17. Rathmell J. & Thompson C. (2002). Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*. 109: 97-107.
18. Wu M. Et-al. (2001). Apoptosis Molecular Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*. /www.els.net.
19. Adams J & Coty S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cells survival. *Science*. 281:1322-1326.
20. Boyd J (1995) Bik a novel death inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*. 11: 1921-1928.

21. Verma S. Et-al. (2000). Structural analysis the human pro-apoptotic gene Bik: Chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences. *Gene* 254: 157-162.
22. Peter D. Et-al. (1999). Expression of the Death Gene Bik/Nbk promotes sensitivity to Drug-Induced Apoptosis in corticosteroid-Resistant T-Cell Lymphoma and Prevents Tumor Growth in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Blood*. 94: 1100-1107.
23. García Hernández N, Arenas Aranda D. (2003). Determinación de los perfiles de expresión génica en neoplasia mamaria mediante microarreglos de DNA. Tesis para obtener grado de maestría en Ciencias Químico Biológicas. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI.