



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Determinación del tamaño del telómero en tejido tumoral de
mama de mujeres mexicanas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ADRIANA SÁNCHEZ

BOISO

Asesor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda.



Universidad Nacional
Autónoma de México

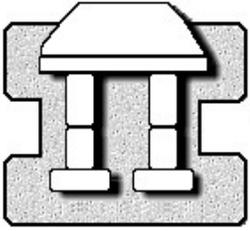


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México 2004.

Dedicatoria

A mis padres:

Ma. Dolores Boiso. Por que con todo lo que haga o diga no me alcanza para agradecerte todo lo que has hecho por mí, tus desvelos y sacrificios y miles de acciones para demostrarme tu gran Amor.

Irineo Sánchez Trejo. Por que no importando que tan difíciles fueran los tiempos, siempre encontraste el camino para que no me faltara nada. Y por ser para mi un ejemplo de Responsabilidad y Lealtad.

Para Benjamín

Morcillo, porque sin ti no hubiera podido llegar hasta este momento. Gracias por que siempre encuentras la manera de motivarme a seguir adelante, aun cuando ya casi he estado a punto de dejarme vencer y llevarme de la mano en todo momento, además de demostrarme día a día tu amor.

Espero que esto recompense un poco de lo ¡Mucho! que me han dado. ¡Los Amo!

Sinceramente

Adriana

Agradecimientos

A las personas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo:

Al Doctor Diego Arenas por la oportunidad, la confianza y el apoyo que me brindo durante la realización de mi tesis. Gracias.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a el Dr. Adán Valladares por su gran ayuda en la recolección de muestras, a la Dra. Elena Hernández por sugerir y apoyarme en la metodología y al Dr. Normand García por su ayuda en todo momento.

A los revisores de tesis: Ramón Víctor Moreno, Ma Eugenia Heres, Irma Dueñas y Laura Castañeda. Por ayudar a mejorar mi errores y por enseñarme a ver lo mis ojos inexpertos no alcanzaron a ver. Gracias.

A los miembros de mi familia:

A todos los Sánchez Trejo y descendencia, por que a pesar de ser tantos y tan diversos, somos una gran familia. En especial a los que ya no están con nosotros y a mi tío Justino que ahora esta pasando momentos difíciles.

A todos los Boiso Esquivel y descendencia, por que dentro de todo lo bueno que de ellos he aprendido, el mejor ejemplo que me han dado es el Amor y Respeto. Especialmente a mi mamá Lisita y papá Félix por mostrarme siempre su amor incondicional. Y a la memoria de los que ya se han ido.

A mis hermanos Jorge y su familia, Jaime y José Luis, pero en especial mi hermana Evelyn.

A las personas que me han contagiado su devoción por la Biología y la Genética.

Al Biólogo Víctor Hugo Amezcua Caro. Por que sus buenísimas clases me llevaron a decidir mi vocación por la Biología. A los demás Biólogos, Profesores y amigos que me guiaron en mi formación Mencionando de manera especial a mi Maestro de Genética Diego Arenas.

A mis amigos y compañeros:

A los compañeros y amigos de toda la vida C.P. Margarita Arreguín, LAE. Paloma Correa, ING. Pedro Miranda CD. David Vega, AMF. Martha García y Noe Peña. También a todos los compañeros y amigos de Iztacala, que necesitaría dos hojas para nombrarlos a todos. Pero en especial a los trillizos Marcos, Roberto Y Omar. Por hacerme reír y hacer ameno cualquier momento.

Resumen

Los telómeros son estructuras especializadas con secuencias repetidas de TTAGGGn, localizadas en los extremos de los cromosomas, que cumplen funciones de protección y estabilización, estos se recortan durante cada división celular sirviendo como reloj mitótico que regula el número de replicaciones celulares. No obstante, la enzima telomerasa compensa la pérdida de la secuencia telomérica, está solo se encuentra activa en células germinales y pluripotenciales, también se ha demostrado su actividad en la mayoría de las células neoplásicas. Las enfermedades neoplásicas son un problema a nivel mundial, en México el cáncer de mama es la segunda causa de muerte después del cáncer cervicouterino. El estudio del comportamiento del telómero a nivel molecular ayudaran a implementar marcadores de desarrollo e implementar herramientas de diagnostico que ayuden a disminuir la alta mortalidad asociada a estas patologías. Se analizaron ocho muestras de tejido tumoral mamario y como control dos tejidos mamarios sin proceso neoplásico de regiones adyacentes de la misma mama. Se utilizaron las metodologías de: Extracción de ADN de tejido con proteinasa K y la técnica de fragmentos de restricción terminal (TRF). Los resultados obtenidos demostraron una gran heterogeneidad del tamaño del telómero, estos fueron de 1217 pb a 22,154 pb. El tamaño del telómero en dos casos fue mayor al máximo esperado, ya que rebaso el tamaño máximo reportado para las células somáticas, este resultado nos pudiera indicar de manera indirecta una síntesis *de novo* del telómero por la reactivación de la telomerasa. Sin embargo, en las muestras control el tamaño del telómero fue mayor que las del tejido neoplásico, este resultado pudiera proponer, que el mantenimiento del tamaño del telómero en estas células puede utilizar una ruta independiente a la actividad de la telomerasa y que las células que escapan a apoptosis medida por p53 y adquieren la capacidad de proliferación desenfrenada esta proliferación llevara a la célula a recortar críticamente sus telómeros hasta que un mecanismo de mantenimiento o síntesis del telómero se active y sea una de las causas que llevan a la genesis del cáncer.

Índice

Dedicatoria.	
Agradecimientos.	
Resumen.	
Índice.	4
I. Introducción.	5
1.1 El telómero su estructura y función.	6
1.2 Telomerasa.	9
1.3 Telómero, telomerasa, envejecimiento y cáncer.	11
1.4 El cáncer.	13
1.5 Cáncer de mama, mortalidad, incidencia y tendencias en México.	15
1.6 Anatomía de la mama y características neoplásicas.	15
1.7 Sistema de clasificación del cáncer de mama.	16
1.8 Genética molecular del cáncer de mama.	16
III. Justificación.	17
IV. Objetivo General.	18
4.1 Objetivos particulares.	18
V. Materiales y métodos.	19
5.1 Muestras biológicas.	19
5.2 Extracción del ADN genómico a partir de tejido normal y tumoral con proteinasa K.	19
5.3 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría e integridad por electroforesis.	20
5.4 Análisis del tamaño del telómero mediante TRF.	21
5.4.1 Restricción de ADN genómico de alto peso molecular.	22
5.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.	22
5.4.3 Tratamiento del gel.	23
5.4.4 Southern Blot.	23
5.4.5 Marcaje de la sonda.	23
5.4.6 Pre-hibridación.	24
5.4.7 Hibridación.	24
5.4.8 Lavados astringentes.	24
5.4.9 Detección.	25
VI. Resultados.	26
6.1 Obtención de ADN a partir de tejido mamario neoplásico.	26
6.2 Determinación del tamaño del telómero.	28
VII. Discusión.	32
VIII. Conclusiones.	34
Referencias.	35

I. Introducción

El desarrollo de la Biología celular, Molecular y la Genética, sumada a la participación de éstas, en la ciencia de la salud, está proporcionando cambios muy importantes en el enfoque actual de la Medicina¹. El desarrollo de las técnicas del ADN recombinante, la producción sintética de oligonucleótidos, el aislamiento de enzimas que cortan y ligan el ADN en sitios específicos, la obtención de vectores de clonación, métodos de hibridación de ácidos nucleicos; de secuenciación y amplificación, así como una mejor comprensión de la expresión génica, han permitido la implementación de herramientas de diagnósticos moleculares muy precisas y confiables^{1,2}.

Actualmente la Biología Molecular y Celular es un campo de investigación de rápido crecimiento, la apreciación de las similitudes y discrepancias entre las células, lo mas característicamente importante para entender la Biología celular³. Esta comparación entre los diversos tipos celulares proporciona un marco común para la Biología celular, permitiendo que los principios básicos aprendidos a partir de un solo tipo de célula puedan ser aplicados en cualquier tipo Celular⁴. Por lo anterior es importante reconocer que el progreso de la Biología celular y la Genética, dependen también de los instrumentos experimentales que permiten a los científicos hacer nuevas observaciones o desarrollar experimentos novedosos^{1,4}.

1.1 El telómero su estructura y función

Los telómeros son estructuras superenrolladas que se encuentran en los extremos de los cromosomas eucariotas, por lo que se les ha denominado capuchas cromosómicas⁵⁻⁸. El ADN telomérico humano tienen entre 5 - 15 Kb, de secuencias repetidas en tándem (TTAGGG) en forma de doble cadena con excepción de la parte final del extremo 3' donde de 100 a 200 nucleótidos son de cadena sencilla (Fig.1a). Griffith y De Lange¹⁰ descubrieron mediante microscopía electrónica, unas estructuras en forma de asa (Loops) situadas en la parte final del telómero. La formación de estas estructuras se debe a una secuencia rica en guaninas, que permite el plegamiento de las cadenas por complementariedad y la proteína *TRF2* que las mantiene estables, haciendo posible la formación de dos lazadas, una mayor denominada "t-loop", y una segunda más pequeña conocida como "d-loop" formada por la inserción de la cadena telomérica sencilla, con una región complementaria de nucleótidos que se encuentra en el ADN telomérico de doble cadena^{7,8} (Fig.1b).

El telómero tiene asociadas varias proteínas dispuestas a lo largo de sus cadenas, esta asociación constituye una estructura única de cromatina no nucleosomal llamada "telosoma". Las proteínas *TRF1* y *TRF2* regulan de manera negativa el tamaño del telómero, situándose en la doble cadena. La proteína *Pot1* actúa como cubierta protectora del telómero y se encuentra en el extremo de la cadena sencilla⁶⁻¹⁰ (Fig.1c).

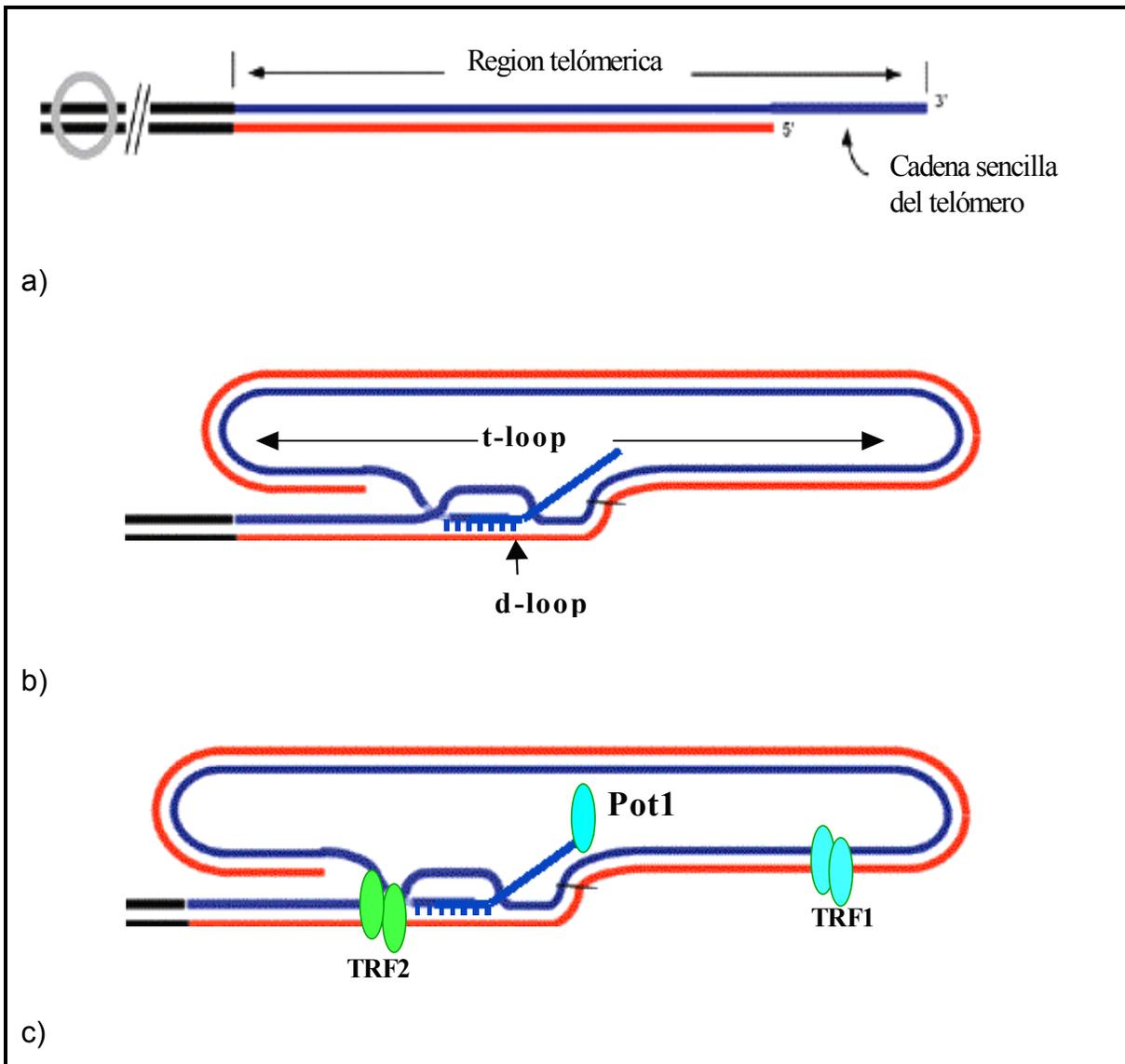


Figura 1. Representación esquemática del Telosoma a) Se observa la estructura de doble cadena del telómero, exceptuando la parte final del extremo 3' que es de cadena sencilla. La región telomérica en humanos está conformada por repetidos en tandem de (TTAGGG). b) Esquema donde se aprecia la formación de las asas teloméricas. El t-loop es el de mayor tamaño, en donde el ADN telomérico de doble cadena está presente en casi todo el loop. El loop menor conocido como d-loop está formado por una parte de la cadena sencilla, que se une a una región complementaria localizada en el ADN telomérico de doble cadena. c) Representación esquemática que muestra algunas proteínas asociadas al telómero, como *TRF1* y *TRF2* que se asocian a la doble cadena y *Pot1* unida a la cadena sencilla.

Hasta el momento se conoce un mayor número de proteínas asociadas al telómero con diferentes funciones (Ver Tabla1).

Tabla 1. Proteínas asociadas al telómero y su función²¹

Proteína	Función
<i>TRF 1</i>	Unida a la doble cadena de repetidos telomericos (TTAGGG), regula negativamente la longitud del telómero, presente en el t-loop y promueve el apareamiento de las cadenas telomericas ^{10,22,23} .
<i>TRF2</i>	Unida a la doble cadena de repetidos telomericos (TTAGGG), regula negativamente la longitud del telómero, involucrada en la formación de los loops, la pérdida de su función ocasiona la fusión de extremos cromosómicos. Y dispara la senescencia y apoptosis medidas por <i>p53</i> y <i>ATM</i> ²⁴⁻³²
<i>Pot1</i>	Unido a la cadena simple de repetidos TTAGGG, necesaria para la protección del telómero ^{33,34}
<i>TIN2</i>	Unida a la proteína <i>TRF1</i> , actúa como regulador negativo de la longitud del telómero, reforzando la actuación de <i>TRF1</i> en el apareamiento de los repetidos telomericos ³⁵
<i>TANK1</i> (<i>tankyrasa 1</i>)	Inactiva a <i>TRF1</i> por poli-ADP-ribosilación. Provocando el alargamiento del telómero ^{36,37}
<i>TANK2</i> (<i>tankyrasa 2</i>)	Unida a la proteína <i>TRF1</i> , función no determinada ³⁸
<i>hRAP1</i>	Unida a la proteína <i>TRF2</i> , actúa como un regulador positivo del telómero ³⁹
<i>PINX1</i>	Unida a la proteína <i>TRF1</i> , implicado en la inhibición de la telomerasa ⁴⁰
<i>Rad50/Mre/Nbs1</i>	Complejo de reparación del ADN ligado a los telómeros, mediante una asociación con la proteína TRF2 ^{41,42}

Los telómeros llevan a cabo las siguientes funciones:

- Protección, evitando la pérdida de genes por degradación o recombinación.
- Estabilización, evitando que los extremos de los cromosomas formen estructuras alteradas o que se fusionen extremo con extremo.
- Aseguran la replicación completa de los cromosomas, sin la pérdida de nucleótidos del extremo 5' de cada hebra de ADN.
- Pero su función más notoria, es servir como un reloj mitótico que regula el número de replications celulares de los distintos tipos de células⁸⁻¹¹.

1.2 Telomerasa

En células somáticas, los telómeros disminuyen progresivamente su longitud en cada ciclo de división celular, perdiendo de 50 a 100 pb, a causa de la incapacidad de la ADN polimerasa para sintetizar el telómero. Después de un determinado número de divisiones celulares, el telómero se reduce a un punto crítico. Este acortamiento pudiera eliminar genes indispensables para la vida o silenciar genes cercanos por un fenómeno conocido como “efecto de la posición del telómero”^{12,13}. Alcanzado el punto crítico de acortamiento, se manda una señal de paro a la división celular, dando origen a su senescencia celular. Una vez alcanzan la senescencia, estas células son llevadas a apoptosis^{5,6,8,9}.

En humanos, existe un complejo ribonucleoproteico conocido como telomerasa, encargado del alargamiento del telómero. La telomerasa (Figura 2) esta constituida por¹¹:

- Una subunidad de RNA telomerasa (hTR) de 445 nucleótidos.
- Una plantilla de RNA con 11 nucleótidos, (5'CUAACCCUAAC-3'), complementaria a la secuencia 5'-GTTAGGGTTAG-3' del telómero.
- Una subunidad catalítica denominada telomerasa transcriptasa reversa (hTERT).

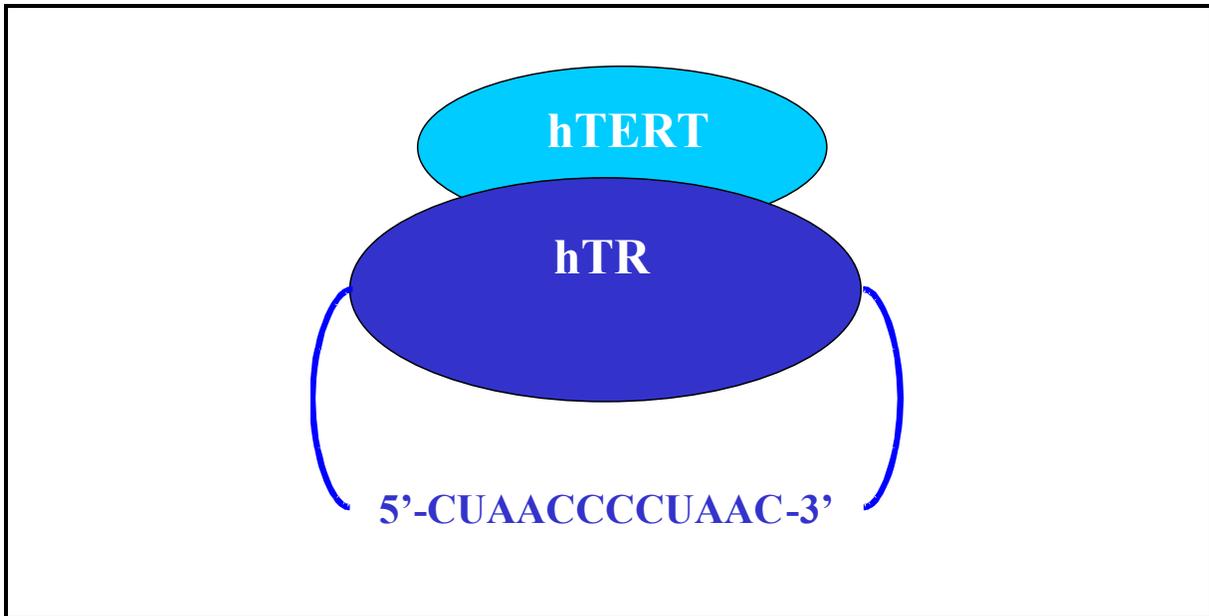


Figura 2. Representación de la proteína telomerasa. Se muestra la subunidad hTR, en la que se encuentra unida la plantilla de RNA, complementaria a la secuencia del telómero. También se observa la subunidad telomerasa transcriptasa reversa (hTERT).

La telomerasa se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas pero en humanos, se ha encontrado activa en células germinales y pluripotenciales. En células hematopoyéticas normales, la actividad de la telomerasa es variable dependiendo de su fase de diferenciación¹⁴⁻¹⁷.

El comportamiento del telómero y la actividad de la telomerasa en el desarrollo de las células cerebrales no ha sido determinado satisfactoriamente. Klapper *et al.* (2001), reportaron que la expresión de la telomerasa es variable durante el periodo de desarrollo del cerebro de ratón¹⁸.

1.3 Telómero, telomerasa, envejecimiento y cáncer

La ausencia de la telomerasa en las células somáticas permite la pérdida de los repetidos teloméricos y en consecuencia la disminución en el tamaño del telómero. Una longitud crítica del telómero es la señal para detener la división celular, misma que origina la senescencia celular. En humanos, esta senescencia acarrea el proceso de envejecimiento y las enfermedades concernientes a esta edad. Por otra parte, la pérdida del telómero en los cromosomas puede conducir a aberraciones cromosómicas, (inversiones, pérdidas o fusión entre los extremos de los cromosomas) que desestabilizarían el genoma.

Por lo anterior la importancia del tamaño del telómero sobre el potencial proliferativo de las células y su capacidad para evitar aberraciones cromosómicas lleva a la conclusión de que a mayor longitud del telómero, mayor será la estabilidad del genoma. Por lo anterior, teóricamente podría evitarse la senescencia celular y consecutivamente detener el proceso de envejecimiento.

Sin embargo, para mantener la longitud del telómero en las células somáticas sería necesario activar la telomerasa. Diversos estudios han demostrado que; la actividad de ésta puede inhibir la diferenciación celular y promover la inmortalidad celular, implicado el desarrollo del cáncer. Mediante la técnica de amplificación de repetidos teloméricos (TRAP), se ha podido detectar la actividad de la telomerasa en un alto porcentaje de tejidos tumorales¹⁹.

El estudio del comportamiento del telómero en los diversos tipos celulares pretende explicar la participación de éste en los procesos biológicos, como son el ciclo celular y el cáncer (Figura 3)²⁰.

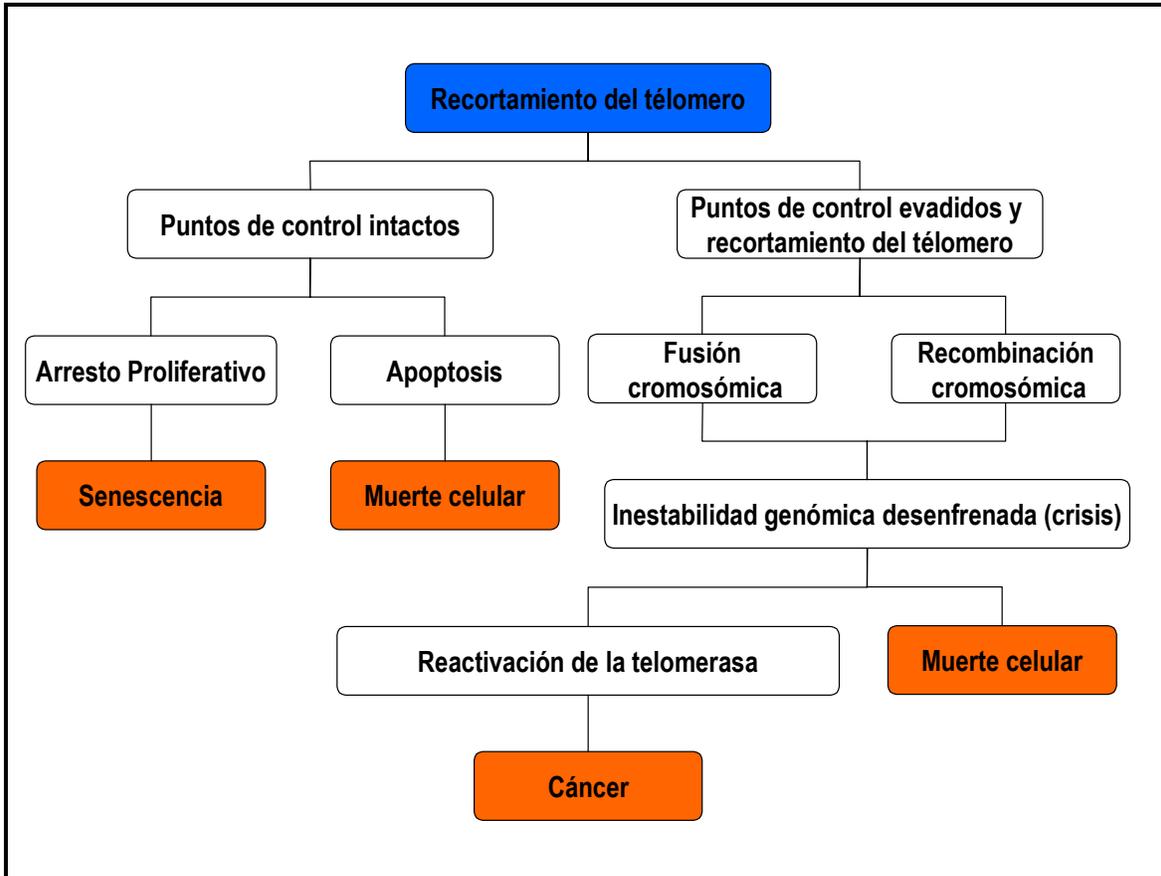


Figura 3. Los télomeros se acortan durante la proliferación celular. En las células somáticas, los télomeros cortos, activan el punto de control que induce a apoptosis o el arresto de la proliferación celular (senescencia). Cuando las células evaden estos puntos de control, los télomeros se siguen recortando hasta que se vuelve sustrato para la reparación del ADN aberrante. Con poca frecuencia la activación espontánea de la telomerasa en la etapa de crisis, asegura y permite el mantenimiento del nuevo arreglo genómico, que le confiere una capacidad indefinida de restauración, que mantiene el desarrollo del cáncer (modificado de Wong y Collings 2003)²⁰.

En este último se ha dado gran importancia a la activación de un mecanismo de mantenimiento del telómero, esencial para su inmortalización. Aunque se ha considerado a la telomerasa el principal mecanismo del mantenimiento del telómero que confiere la proliferación de las células neoplásicas, Bryan et al. (1997)⁴³ y Yan et al. (1999)¹⁷ han reportado la ausencia de la actividad de la telomerasa en diversos tejidos tumorales. Sin embargo, algunos telómeros eran muy largos y heterogéneos, revelándose un nuevo mecanismo independiente de la telomerasa denominado Alargamiento Alternativo del Telómero (ALT). Este alargamiento, también conocido como “Ruta Alternativa”, aun no se ha definido íntegramente. En la actualidad, se estudia si existen diferencias funcionales entre células de neoplasias humanas que utilicen la telomerasa o la ruta alterna⁴³ para el mantenimiento de su telómero. El conocimiento del comportamiento y tamaño del telómero, en células neoplásicas servirá para implementar herramientas de diagnóstico y pronóstico para el tratamiento contra el cáncer.

1.4 El cáncer

En la proliferación celular, en condiciones normales, las células crecen de manera ordenada por la acción de los puntos de control del ciclo celular, que permiten que las células pasen de una división a otra. Sin embargo, cuando por alguna causa las células escapan a estos puntos de control acumulan daños sobre su ADN (mutaciones) lo que origina una desregulación sobre la proliferación celular y evasión de la apoptosis. Esta desregulación del crecimiento origina un aglutinamiento celular, denominada tumor. Estos tumores se clasifican en benignos o malignos; en los primeros, las células presentan un comportamiento y características similares al tejido de origen, manteniéndose en el mismo. Los tumores malignos tienen la capacidad de irrumpir los tejidos adyacentes y diseminarse a otras zonas del cuerpo, fenómeno conocido como metástasis. Las células de estos tumores tienen una morfología y función diferente al tejido de

origen, como causa de su rápida proliferación, que les impide madurar y diferenciarse^{44,45}.

Los tumores malignos se pueden presentar en cualquier parte del cuerpo, es por esto que se les clasifica de acuerdo al tejido de origen: el carcinoma es el más común entre los diferentes tipos de cáncer, se desarrolla en las células que cubren las superficies externas e internas del cuerpo; los sarcomas surgen de las células que se encuentran en los tejidos que sostienen el cuerpo como el hueso, el cartílago, el tejido conectivo, el músculo y la grasa; los linfomas son cánceres que se originan en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmune del cuerpo y las leucemias son células inmaduras de la sangre producidas en la médula ósea que tienden a acumularse en grandes cantidades dentro del torrente sanguíneo⁴⁴.

Durante el proceso de transformación de las células normales a células cancerosas ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la proliferación de la neoplasia. Avances recientes han permitido enfocar la investigación del cáncer hacia la identificación de algunos de sus factores etiológicos. El estudio del ciclo celular y su regulación ha permitido conocer, cómo la fidelidad e integridad de la replicación del genoma son salvaguardadas por las funciones coordinadas de los puntos de control y de los sistemas de reparación del ADN. El funcionamiento adecuado de los procesos puede ser alterado por mutaciones genéticas. Lo que sugiere que los mecanismos moleculares de regulación que participan en la transformación celular pueden ser empleados como sistemas potenciales para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer^{45,46}.

Eventos multifactoriales son causa de incremento significativo de las neoplasias malignas en nuestra población, por lo que su estudio debe abordarse a

diferentes niveles. Estas enfermedades actualmente son uno de los principales problemas de Salud Pública que enfrentan los países en el mundo. De acuerdo a las estadísticas globales, los más frecuentes son los de pulmón, mama y próstata^{47,48,49}.

1.5 Cáncer de mama, mortalidad, incidencia y tendencias en México

De las enfermedades neoplásicas, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en México. A nivel nacional, durante el 2001 causó 3,574 defunciones arrojando una tasa de 7.0 por cada 100 000 habitantes, siendo más frecuente en mujeres mayores de 35 años. La tendencia de mortalidad de esta enfermedad va en aumento siendo de 2.2 en 1985 y de 3.3 en 1995, presentándose con mayor frecuencia en mujeres con edades entre 45 y 55 años, Para las próximas décadas se espera que las expectativas de vida en nuestro país aumenten, por lo que esta neoplasia deberá incrementar su número en nuestra población, convirtiéndose posiblemente en el cáncer más frecuente en mujeres pertenecientes al grupo de edad con mayor riesgo^{50,51}.

1.6 Anatomía de la mama y características neoplásicas

La mama está conformada por glándulas mamarias, grasa, vasos linfáticos (que transportan células de defensa) y vasos sanguíneos. El tejido mamario consta de glándulas agrupadas en racimos, llamados lóbulos y conductos que comunican los lóbulos con el pezón. El cáncer de mama puede ser de varios tipos; el más común se llama carcinoma intraductal y se caracteriza por el crecimiento anormal de las células que conforman los conductos lácteos. Este cáncer también se puede originar en los lóbulos, caso en el que se llama cáncer lobular. Existe otro cáncer de la glándula mamaria denominado carcinoma inflamatorio, llamado así porque asemeja una infección; la piel se pone roja, caliente y dolorosa, como si fuera un absceso.

1.7 Sistema de clasificación del cáncer de mama.

El cáncer de mama en la mayoría de los casos es un proceso progresivo y para determinar su nivel de desarrollo se hace uso del sistema TNM que permite una descripción anatómica de la enfermedad por la valoración de tres componentes donde: T refiere la extensión del tumor, N la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares (GLA) y M la presencia de metástasis a distancia. Este sistema permite clasificar el cáncer en diferentes etapas, en la etapa I el cáncer no es mayor a dos centímetros y se mantiene en el tejido mamario; la etapa II se subclasifica en IIA y IIB, en el primero el cáncer no mide más de 2 centímetros, pero ya se ha diseminado a los GLA o cuando el tumor mide entre 2 y 5 cm. pero se mantiene en el tejido mamario. En la etapa IIB el cáncer mide entre 2 y 5 centímetros y se ha segregado a los GLA. La etapa III también se subdivide en A y B, el cáncer en la etapa IIIA puede ser menor de cinco centímetros y se ha diseminado a los GLA y éstos pueden o no estar unidos a otras estructuras; en el IIIB el cáncer ha irrumpido en tejidos cerca de la mama como a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón. Finalmente en el estadio IV el cáncer ha invadido a otras partes del cuerpo como los huesos, pulmones o demás ganglios del cuerpo.

1.8 Genética molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama se puede manifestar en forma espontánea o hereditaria. Existen diversos factores genéticos involucrados en el cáncer de mama, en el tipo hereditario, se ha atribuido a la mutación germinal en los genes *BRCA1* y *BCR2*, éste último se ha relacionado con cáncer de ovario. Otros involucrados son los genes que codifican para *c-myc*, *Ras*, *bcl2* y *erbB2/neu* y también algunos supresores como *Rb*, *p53* y *ATM*. Además de los mecanismos involucrados en evitar la extinción telomérica, como la actividad de la telomerasa y el alargamiento alternativo del telómero que evitan enviar a la célula a senescencia o apoptosis.

III. Justificación.

El 40% de los países del mundo poseen información sobre la mortalidad por cáncer mientras que sólo el 15% dispone de información fiable sobre su incidencia. A partir de los resultados de incidencia obtenidos por los registros de cáncer de base poblacional existentes en el mundo y de los datos de mortalidad mundial disponibles, se puede estimar que se producen más de 8 millones de casos nuevos de cáncer al año (con excepción de los cánceres de piel diferentes del melanoma).

En nuestro país el cáncer de mama ocupa el segundo lugar en mortalidad en mujeres después del cáncer cérvico uterino. El estudio de esta neoplasia se ha dificultado debido a la gran heterogeneidad histológica y clínica que presenta.

Por todo esto, los estudios moleculares en las neoplasias son de gran importancia para conocer el fenómeno a nivel básico y para poder definir marcadores moleculares de progresión de la enfermedad. El estudio sobre comportamiento del telómero y su relación con el cáncer de mama, pudiera ayudar a explicar su participación en esta neoplasia lo que en un futuro permitirá implementar tratamientos que ayuden a disminuir la alta mortalidad asociada a estas patologías. Asimismo, incrementar la investigación a nivel molecular en nuestro país y los resultados destinarlos en beneficio de la población mexicana.

IV. Objetivo General.

Determinar el tamaño del telómero en tumores mamarios de mujeres mexicanas.

4.1 Objetivos particulares

1. Obtener una colección de ADN genómico de tumores mamarios de mujeres mexicanas.
2. Determinar mediante la técnica de fragmentos de restricción terminal (TRF) el tamaño de los telómeros en tumores mamarios.

V. Materiales y métodos

5.1 Muestras biológicas

De mujeres nacidas en México con padres y abuelos mexicanos, se estudiaron ocho tumores resecables de las etapas II y III que no recibieron ningún tipo de terapia. Como control se analizaron dos tejidos mamarios sin proceso neoplásico, de regiones adyacentes de la misma mama, referidas al Hospital de Oncología del IMSS, con diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer mamario. Los tejidos utilizados poseían los siguientes números de registro:

T1 = PQ439100

T2 = 3431-00

T3 = 337

T4 = MZ2935

T5 = 3075-0

T6 = 001133

T7 = 3276MT

T8 = 866-00

T9 = FAT1

N9 = FAN1

T10 = FAT2

N10 = FAN2

T= Tejido tumoral N= Tejido no neoplásico (control)

5.2 Extracción del ADN genómico a partir de tejido normal y tumoral con proteinasa K⁵²

El tejido fue congelado con nitrógeno líquido, y cortado en trozos con ayuda de un bisturí. En un mortero y pistilo previamente esterilizados y enfriados, se pulverizó,

el tejido añadiendo nitrógeno líquido siempre. Se adiciono 1.2 ml de solución de lisis por cada 100 mg de tejido (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris- HCl , pH 8, 25 mM de EDTA, pH 6, 0.5% de SDS, 0.1 mg/ml de proteinasa K) incubando de 12 – 18 hrs. a 50 °C con agitación constante. Posteriormente se realizó la extracción del ADN con fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1). Se centrifugo 5 min. a 3000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se precipitó el ADN con ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando manualmente por inversión y centrifugando 3 min. a 15 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%. La pastilla de ADN se resuspendió en 200-500 ml de agua des-ionizada estéril.

5.3 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría e integridad por electroforesis⁵⁴

Con espectrofotometría y geles de agarosa se determinó la concentración y el grado de pureza del ADN. En una celdilla de cuarzo con 98 ml de agua des-ionizada estéril se resuspendieron 2 µl de la solución del ADN, se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm. La lectura de absorbancia obtenida a 260 nm se multiplicó por el factor de dilución (1/50) y la constante de una densidad óptica (50 ng), el resultado fue la concentración de la muestra en ng/µl. La relación 260/280 nm de la absorbancia indica la pureza de la muestra, está determina el promedio de absorción aproximado de las bases nucleotidicas. Asimismo se prepararon geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE (890 mM de tris-borato, 890 mM de ácido bórico, 20 mM EDTA) con bromuro de etidio (0.5 mg/µl). En los pozos del gel se agregó 1.0 µl de ADN tumoral con 1.0 µl del colorante de carga (azul de bromofenol 0.25%, cianol-xileno 0.25% y glicerol al 30%) y en otro pozo se colocó 1.0 µl del marcador λ *HindIII* (500 ng/µl). Posteriormente se aplicó una corriente de 100 voltios durante 20 min. Una vez pasado este tiempo los geles se observaron a través de un trans-iluminador de UV a 260 nm. para observar la integridad del ADN. Se tomaron fotografías digitales y fueron analizadas mediante el programa ISO 1000.

5.4 Análisis del tamaño del telómero mediante TRF⁵³

Una vez obtenida la concentración e integridad deseada del ADN se implementó la técnica conocida como método de fragmentos de restricción terminal (TRF) procediendo de la siguiente manera (Figura 4).

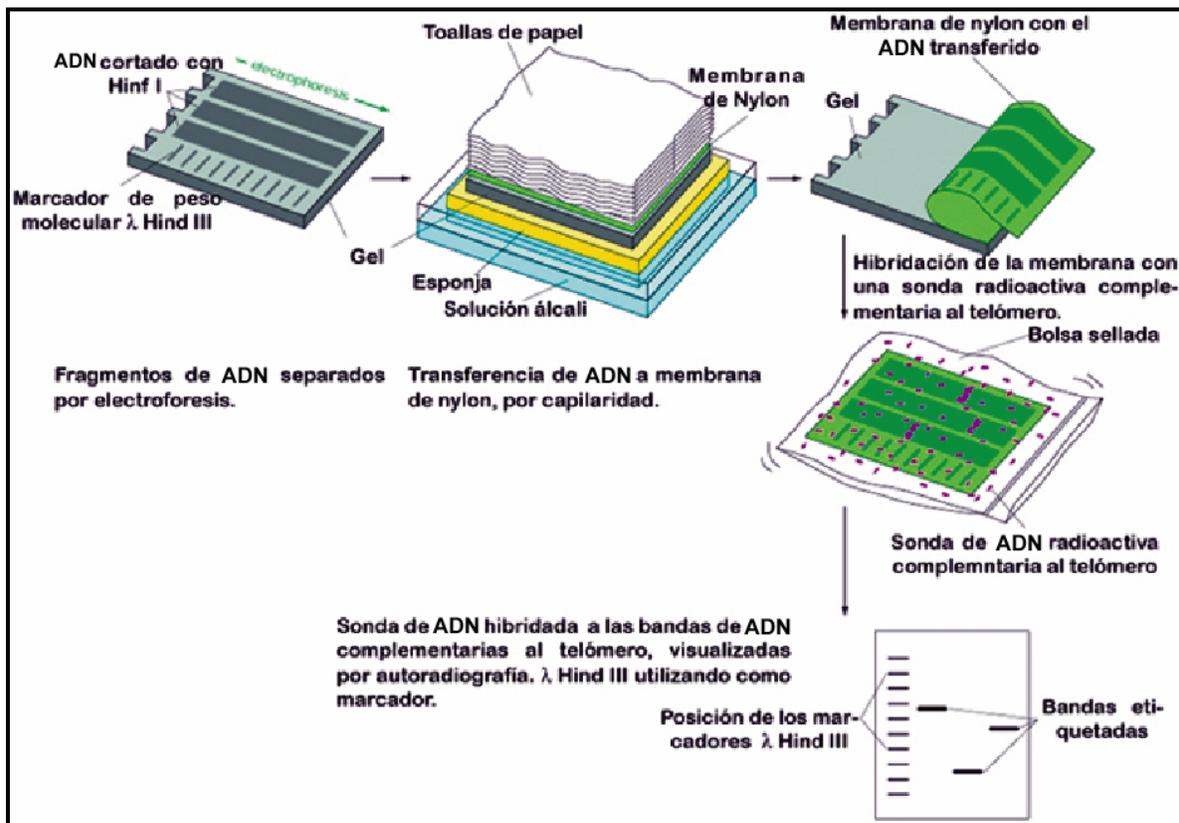


Figura 4.-Ensayo TRF descrito por Bryan⁵³ para determinar el tamaño del telómero. El ADN es cortado con una enzima de restricción de corte frecuente, los productos de restricción son sometidos a electroforesis en un gel de agarosa, transferidos a una membrana de nilón y fijados con luz ultravioleta. La membrana se hibridó con una sonda marcada complementaria a la secuencia telomérica. La membrana se expuso a una placa autoradiográfica.

5.4.1 Restricción de ADN genómico de alto peso Molecular

10 mg de ADN fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinfl* de Promega (10 U/ μ l). Se colocó el ADN con el amortiguador H, incubando cuatro horas a 4°C agitando cada 20 minutos con un vortex, una vez terminada la incubación se agregó una alícuota de la enzima de restricción (4 μ l) y se agitó con vortex durante 2-3 min. Se centrifugó la muestra unos segundos y se incubó durante 30 minutos a la temperatura óptima para la enzima (37°C). Después de la incubación se agregó una nueva alícuota de la enzima, se agitó y centrifugó nuevamente y se incubó a 37°C durante 12 horas. Se precipitó la muestra con 2 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en 20ml de agua des-ionizada estéril.

5.4.2 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó agarosa al 0.8% en amortiguador TBE al 1%, la mezcla se desnaturalizó a una temperatura aproximada de 90°C y se vació en el molde para gel, de la cámara de electroforesis. Con ayuda de los peines se crearon los pozos en los que se colocaron las muestras. Una vez solidificada la agarosa se quitó cuidadosamente el peine y la cámara se saturó con el amortiguador TBE 1%, en los pozos se colocaron los 20 μ l de ADN productos de la restricción y 5.0 μ l de colorante de carga (azul de bromofenol 0.25%, cianol xileno 0.25% y glicerol al 30%), con ayuda de una micropipeta, también se colocó en otro pozo 1.0 μ l del marcador λ *HindIII* (500 ng/ μ l). La electroforesis se realizó durante 20 horas, aplicando una corriente de 40 voltios con el propósito de obtener una mayor resolución de las bandas del marcador. Después de la electroforesis el gel se colocó en una solución con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante cinco minutos y se observó a través de un trans-iluminador de UV tomándose una fotografía digital

5.4.3 Tratamiento del gel

Posteriormente el gel fue tratado con diversas soluciones a temperatura ambiente y en agitación constante como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Soluciones y tiempo de lavado para el tratamiento del gel

Solución	Tiempo de lavado
Solución depurinizadora (0.25 M HCl)	10 minutos
Agua destilada	30 segundos
Solución desnaturalizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)	40 minutos
Agua destilada	30 segundos
Solución neutralizante(1 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)	20 minutos
Agua destilada	30 segundos
Solución neutralizante(1 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)	20 minutos

5.4.4 Southern Blot

Una vez terminados los lavados se procedió a transferir por capilaridad el ADN del gel a una membrana de nilón utilizando una solución salina SSC 20x (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M) como se muestra en la Figura 4. La transferencia se realizó por 18 horas. Pasado este tiempo se desmanteló el dispositivo y la membrana de nilón se lavó por diez minutos con una solución SSC 2X, para limpiar cualquier residuo de agarosa y/o sales. La membrana se dejó secar sobre un papel filtro, una vez seca el ADN se fijó a ésta empleando radiación UV (a 2000 Joules durante 30 segundos). El gel ya deshidratado por la transferencia fue teñido nuevamente con bromuro de etidio y observado en un trans-iluminador, para verificar que no quedaran residuos de ADN en el gel.

5.4.5 Marcaje de la sonda⁵⁵

Posteriormente se realizó el marcaje de la sonda con Digoxigenina-dUTP mediante “nick translation” utilizando el oligo 5'CCCTAA CCCTAA CCCTAA 3' complementario a la región de repetidos del telómero En un tubo Eppendorf se mezcló con:

- 18.5 μ l de agua bidestilada
- 1.0 μ l de mix¹
- 0.5 μ l del oligo (3000 ng)

La mezcla se desnaturalizó por cinco minutos a 99°C y se incubó durante veinte horas a 37°C. Pasado este tiempo se detuvo la reacción por calor a 65°C por 10 minutos.

5.4.6 Pre-hibridación

La membrana se incubó durante 2 horas con 25 ml de solución de pre-hibridación *DiG Easy Hyb*² a 42° C.

5.4.7 Hibridación

Transcurrido el tiempo de pre-hibridación se incorporó la sonda previamente desnaturalizada a 68°C por 10 minutos. La membrana y la solución (de hibridación) se incubaron en el horno de hibridación durante 24 hrs. a 42°C.

5.4.8 Lavados astringentes

Terminada la incubación la solución de hibridación fue desechada. La membrana fue lavada tres veces durante diez minutos con una solución (SSC 2X y SDS 0.1%) dos veces con solución (SSC 0.1 X y SDS 0.1%) durante quince minutos a una temperatura de 68°C.

¹ (1U/ml polimerasa Klenow, , 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP y 5 × amortiguador para estabilizar la reacción en 50% (v/v) glycerol Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

² Solución de hibridación para blots de ácidos nucleicos con sondas marcados con digoxigenina (Kit comercial) Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

5.4.9 Detección

Una vez finalizados los lavados se procedió a preparar la detección para lo que fue necesario lavar la membrana durante cinco minutos en amortiguador de lavado (0.1M ácido maléico, 0.15M NaCl, pH 7.5) quedando perfectamente húmeda. Se preparó al momento solución de bloqueo haciendo una dilución 1:10 (1 de solución de bloqueo³ por 9 de amortiguador de lavado) y la membrana se incubó durante una hora con una temperatura de 37°C con esta solución. Transcurrido este tiempo se realizó una dilución 1:7500 de Ab-anti-GIG_AP⁴ (4µl de Ab-anti-GIG_AP por 26 ml de solución de bloqueo). Con esta solución se incubó la membrana 30 minutos a 37°C y 30 minutos mas a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron dos lavados con el amortiguador de lavado durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron dos lavados con agitación constante con amortiguador de detección (0.1M tris HCl, 0.1 M NaCl, 50nM MgCl₂ pH 9.5). A continuación se colocó la membrana sobre un acetato nuevo orientando las muestras de ADN hacia arriba; sobre la membrana se colocaron de 500 ml a 1 ml de solución de detección y de tres a cinco gotas de CSPD⁵ hasta humedecer perfectamente la membrana. Sobre la membrana ya humedecida se colocó un nuevo acetato.

Con ayuda de cinta adhesiva se sellaron los extremos de los acetatos que contenían la membrana y se pusieron sobre un casete, inmediatamente se expuso a una placa autoradiográfica y fueron incubados a 37°C durante media hora, al terminar este tiempo se trasladaron a un ultracongelador a -70 °C durante 24 horas. La placa autoradiográfica se reveló en tres charolas de revelado que contenían; solución reveladora (Kodak), agua y solución fijadora (Kodak) respectivamente; la placa autoradiográfica fue sumergida durante dos minutos en cada solución, dejándose secar a temperatura ambiente.

³ 5x SSC; 0.1% N-lauroylsarcosine (w/v), 0.02% SDS (w/v), 1 % Blocking solution (v/v) (Kit comercial) Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

⁴ (Kit comercial) Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

⁵ (,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1.3,7] decan}-4-yl) phenyl phosphate. (Kit comercial) Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

VI. Resultados

6.1 Obtención de ADN a partir de tejido mamario neoplásico.

En el presente estudio se determinó el tamaño del telómero a partir de ADN extraído de ocho muestras de tejido tumoral y dos de tejido mamario sin neoplasia. Las concentraciones de ADN obtenidas fueron de entre 100 a 1,900 ng/ml. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que mostró una degradación mínima y la obtención de ADN de alto peso molecular (Figura 5). Estas fueron almacenadas a -70°C en el laboratorio de Genética Humana (Hospital de Pediatría CMNSXXI) con la finalidad de obtener una colección de éstos. En la figura 6, se muestran los productos de la restricción sometidos a electroforesis en gel de agarosa; en el carril 1 se observan las bandas del marcador de peso molecular $\lambda\text{Hind III}$; en los carriles 2 y 3 se observa un barrido continuo que corrobora la restricción total de las muestras; en el carril 4 se observa ADN control no sometido a restricción.

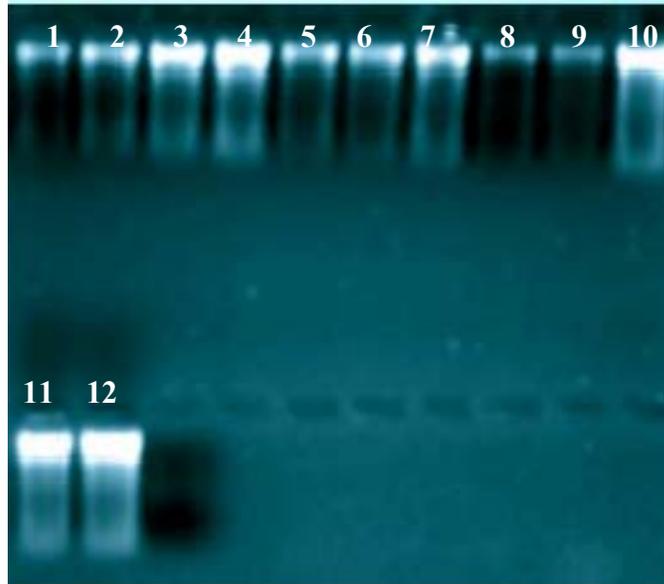


Figura 5. Gel de agarosa al 1%, sometido a electroforesis durante 20 minutos a 120 voltios. En los carriles 1 al 12 se observa ADN de alto peso molecular, resultado de la extracción con proteinasa K; de tejido mamario neoplásico además de observarse una mínima degradación.



Figura 6. Gel de agarosa al 1% con productos de restricción de ADN genómico sometió a electroforesis por 40 minuto a 70 voltios. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ *Hind III*; en los carriles 2 y 3 se observa un barrido continuo, producto de la restricción del ADN con la enzima *Hinf I*, en el carril 4 se observa ADN no sometido a restricción, ambos de tejido tumoral.

6.2 Determinación del tamaño del telómero.

En la Figura 7 se muestran los productos de restricción del ADN tumoral separados por electroforesis en gel de agarosa en el que se logró obtener una mejor resolución de las bandas del marcador de peso molecular y del ADN. Los productos de estos geles fueron transferidos a una membrana de nilón y se hibridaron como se describe en Métodos. La membrana después fue expuesta en una placa autoradiográfica. En la figura 8 se muestra una autoradiografía con los productos de hibridación donde se observan los barridos que corresponden a los diferentes ADN de tumor, las regiones mas oscuras corresponden a las áreas de hibridación, lo que comprueba la hibridación en la secuencia de repetidos del telómero. El tamaño del telómero se determinó, sumando el límite inferior del barrido con el limite superior, obteniendo una media, para establecer el tamaño del telómero. En otro experimento, se determino el tamaño del telómero de dos tejidos tumorales y como control fue utilizado tejido adyacente, no neoplásico de la misma paciente¹

En la Tabla 3 se muestran los resultados del tamaño del telómero, así como la concentración de ADN obtenida a partir de las diferentes muestras de tejido mamario, la edad y el diagnostico histopatológico.

¹ Datos no mostrados

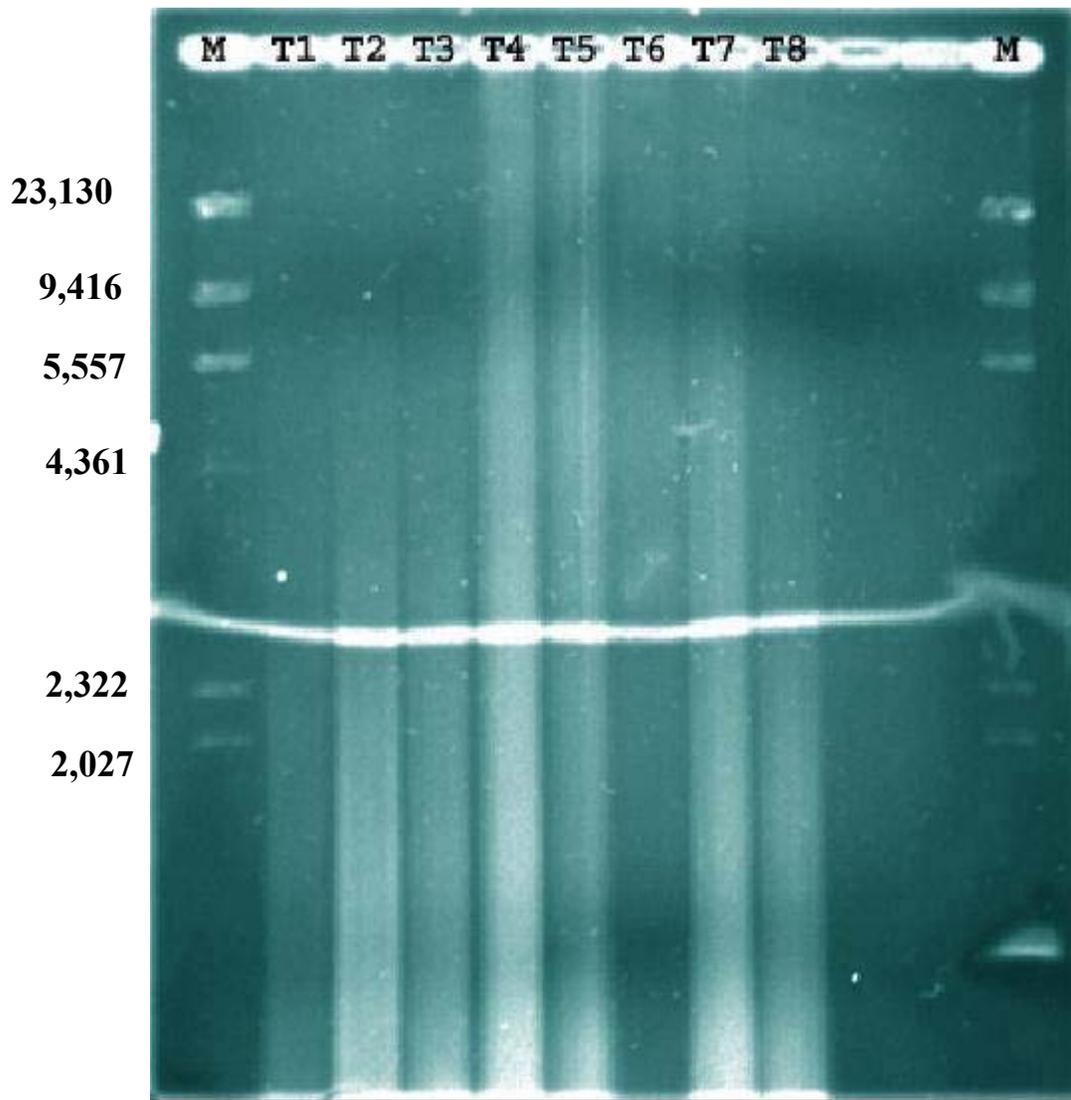


Figura 7. Gel de Agarosa al 0.8% donde se muestran los productos de restricción del ADN tumoral, sometidos a electroforesis durante 20 horas a 40 voltios. M = λ HindIII T1= PQ439100, T2=3431-00, T3=337, T4=MZ2935, T5=3075-0, T6=001133, T7=3276MT, T8=1866-00.

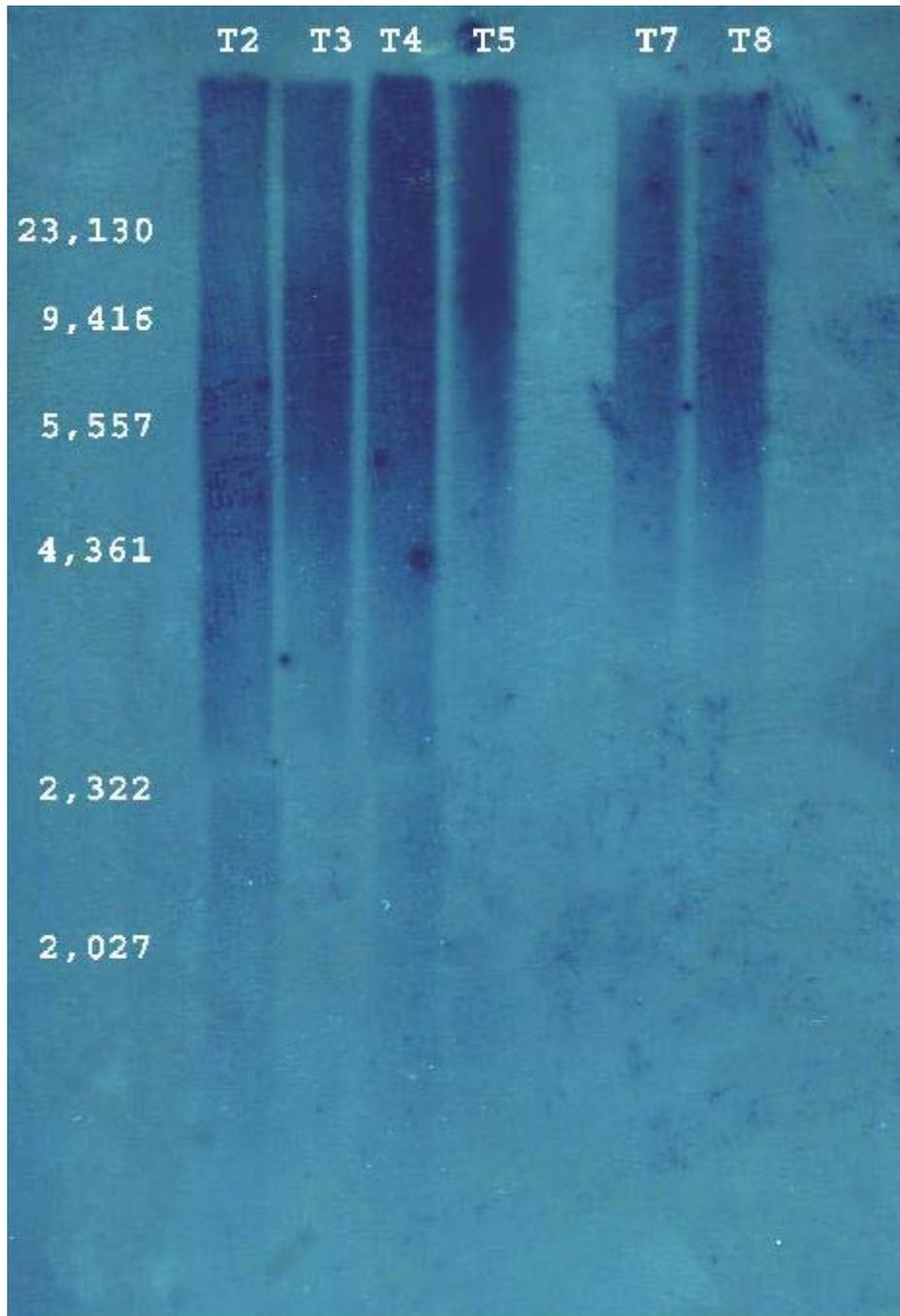


Figura 8. Placa autoradiográfica donde se muestran los productos de hibridación del ADN tumoral con la sonda marcada, complementaria al telómero. En el extremo izquierdo se observan la posición y tamaño de las bandas del marcador λ HindIII, en los carriles se observa el barrido obtenido resultado de la hibridación, las manchas mas intensas determinaron el tamaño del telómero de la diferentes muestras T2=8,064 pb, T3=22,829 pb, T4=18,019 pb, T5=12,829pb, T7=12,073 pb, T8=11,840pb.

Tabla 3. En la presente tabla se muestra el diagnostico histopatológico, etapa, concentración del ADN y tamaño del telómero obtenidas de los diferentes tejidos mamarios.

Núm.	Muestra	Etapa	DNA total (ng/ μl)	Edad	Tamaño del Telómero
T 1	PQ439100	IIA	320	♀ 45 años	No determinado
T 2	3431-00	IIA	1,300	♀ 49 años	8,064pb
T 3	337	III	1,180	No disponible	22,154pb
T 4	MZ2935	III	1,868	♀ 68 años	18,019pb
T 5	3075-O	?	607	♀ >35 años	12,829pb
T 6	001133	IIIB	1,725	♀ 52 años	No determinado
T 7	3276MT	IIIB	1,939	♀ 48 años	12,073pb
T 8	1866-00	IIB	1,300	♀ 46 años	11,840pb
T 9	FAT1	II	350	No disponible	1,217pb
N 9	FAN1	-----	135	No disponible	12,484pb
T 10	FAT2	II	380	No disponible	8,990pb
N 10	FAN2	-----	172	No disponible	11,083pb

VII. Discusión

El telómero en humanos está constituido por secuencias repetidas en tándem de (TTAGGG)_n y se localiza en los extremos de los cromosomas eucariontes, confiriéndoles protección y estabilización, además de funcionar como “reloj mitótico” que limita el número de divisiones celulares; cuando el telómero se recorta a un estado crítico promueve la activación de la proteína p53 para llevar a la célula a senescencia y/o apoptosis. Sin embargo, algunas células escapan a la acción de esta proteína.

Diversas investigaciones han propuesto que el telómero en células somáticas que han escapado a los puntos de control del ciclo celular, se mantiene por la reactivación de la enzima telomerasa así mismo se ha documentado que en el 80% de los tejidos neoplásicos se encuentra activa, proponiéndose como una causa importante de la proliferación desenfrenada de las células cancerosas. Sin embargo, otros tejidos neoplásicos son telomerasa negativos y se ha propuesto que en estas células el mantenimiento del tamaño del telómero se debe a un mecanismo conocido como: Alargamiento Alternativo del Telómero (ALT).

En el presente estudio se analizó el tamaño del telómero en tejidos neoplásicos mamarios. Los resultados obtenidos mostraron una gran heterogeneidad en el tamaño del telómero. En las muestras T3 y T4 se encontró un tamaño del telómero de 22,154 pb y 18,019 pb respectivamente; en este caso se sugiere una síntesis de novo del telómero¹⁶ ya que en células somáticas humanas normales el valor máximo esperado es de 15,000 pb y podríamos apuntar de manera indirecta que hay una reactivación de la telomerasa. En T2, T5, T7 y T8 no se excedió el máximo promedio de las células somáticas.

El tamaño del telómeros de tejido mamario normal en relación al neoplásico se observó en el primer caso un tamaño de 12,484 pb y 1,217 pb, respectivamente. En el segundo caso el tejido normal presentó un tamaño de

11,083pb que fue mayor que el tumoral que presentó un tamaño de 8,990 pb. Estos resultados parecieran ir en contra de lo establecido, donde se ha demostrado que la actividad de la telomerasa es la responsable del mantenimiento del telómero en las células neoplásicas e invariablemente éste no se recortaría ya que la telomerasa se encargaría de compensar la pérdida telomérica y/o podría sintetizarlo de novo como podría ser el caso de las muestras T3 y T4.

Es importante destacar que en los telómeros de tejido neoplásico de las etapas de menor desarrollo (etapa II), en promedio, presentaron un tamaño menor del telómero. Diversos estudios⁴³ proponen una ruta alterna encargada del mantenimiento del telómero y que aun no está bien definida. Por otra parte, este resultado, apoyaría la hipótesis de que hay células con un telómero extremadamente corto, pues se propone que algunas células dañadas logran evadir los puntos de control que las enviarían a senescencia y/o apoptosis. Por lo que su telómero se seguirá desgastando hasta que se vuelvan substratos para la reparación del ADN aberrante. Y la posterior reactivación de la telomerasa en la inestabilidad geonómica, asegurará y permitirá el sustento del nuevo arreglo genómico de las células, que les confiere una indefinida capacidad restauradora, que permite el desarrollo del cáncer.

Así mismo, también se ha estudiado la importancia de las proteínas del telómero. Específicamente TRF2 presenta diversas funciones como regular negativamente la longitud del telómero, participa en la formación del t-loop y promueve el apareamiento de las cadenas teloméricas^{10,22,23}.

El recortamiento del telómero se ha propuesto como un evento importante que inducen la senescencia celular, pero Blackburn⁵ y Eller, et al³¹, han encontrado evidencias de que la senescencia celular no es a causa del recortamiento del telómero, si no de la alteración estructural del telómero. Se sugiere que la que pérdida de la proteína TRF2 dismantlaría la formación del t-loop mismo que originaría que la cadena del extremo 3' quedara expuesta y está sería la señal para la senescencia.

VIII. Conclusiones

El presente estudio es uno de los pioneros en tratar de entender la relación del tamaño del telómero con el desarrollo del cáncer en la población mexicana, pero es necesario profundizar este estudio y tratar de esclarecer el comportamiento del telómero, los mecanismos de mantenimiento y síntesis de éste. Además de la funcionalidad del telosoma, en tejido normal como en neoplásico y así poder caracterizar discrepancias entre uno respecto al otro. De esta manera podríamos obtener marcadores moleculares, presentes en la población mexicana, que puedan ser utilizados como herramientas de pronóstico y diagnóstico y poder desarrollar terapias que ayuden a disminuir los trastornos causados por esta enfermedad.

Referencias

1. Coral-Vázquez R. (2001) Terapia génica: En Guizar V. Genética clínica. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades hereditarias Cáncer y Genética 3ra. Edición. El manual moderno. México. Pp 729-735
2. Salamanca F. (1997) Cáncer y Genética: En Guizar V. Genética clínica. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades hereditarias Cáncer y Genética 2da. Edición. El manual moderno. México. 575-591
3. Coral-Vázquez (1999) R. Aplicación de la Biología molecular en genética clínica. En Guizar J, Zafra G. Atlas: Diagnostico de síndromes genéticos. El Manual moderno. 20-23
4. Cooper GM. (2002). La Célula. 2da. Ed. Marbán Madrid. España pp.3-39.
5. Blackburn EH. (2001). Switching and signaling at the telomere. **Cell** 106: 661-673.
6. McElligott R and Wellinger RJ. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. **EMBO J** 16: 3705-3014.
7. De Lange T. (2002). Protection of mammalian telomeres. **Oncogen** 21: 532-540
8. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW and Wright WE. (2001). Telomere Shortening is proportional to the size of the G rich telomeric 3'. **J Biol Chem** 275: 19717-19722.
9. De Lange T. (1998). Telomeres. **Nature** 392: 753-754.
10. Griffith JD, Comeau L, Rosenfields S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H and De Lange T (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell** 97: 503-514.
11. Blackburn EH. (1991). Structure and function of telomeres. **Nature** 350: 569-573
12. Offir R, Wong ACC, McDermid H E, Skorecki K.L. and Selig G, (1999). Position effect of human telomeric repeats on replication timing. **Proc Natl Acad Sci** 96: 1434-1439.
13. Baur JA, Zou Y, Shay JW and Wright WE. (2001). Telomere position effect in Human Cells. **Science** 292: 2075-2077.
14. Morin GB. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. **Cell** 59: 521-529
15. Kim NW, Piatyszek MA, Prouse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL and Shay J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and Cáncer; **Science** 266: 2011-2014.
16. De Lange T. (1994). Activation of Telomerase in a human tumor. **Proc Natl Acad Sci.** 91(8): 2882-2885.
17. Yan P, Coindre JM, Benhattar J, Bosman FT and Guillou L. (1999). Telomerase activity an human telomerase reverse transcriptase mRNA expression Soft tissue tumors: Correlation with grade, histology and proliferative activity. **Cáncer Research** 59: 3166-3170

18. Klapper W, Shin T, and Mattson MP. (2001). Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice. *J. Neurosci Res.* 64(3): 252-260
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
19. Kim N, and Wu F.(1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acid Res.* 25:2595-2597
20. Wong J and Collins K. (2003). Telomere maintenance and disease Published online May 13, <http://image.thelancet.com/extras/02art7027web>.
21. Kim SH, Kaminker P and Campisi J. (2002). Telomeres, aging and cancer: In search of a happy ending . *Oncogene* 21: 503-511.
22. Chong L, Van-Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P and De Lange T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270:1663-1667.
23. Van-Steensel B and De Lange T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385: 740-743.
24. Billaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T and Gilson E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 17: 236-239
25. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L and De Lange T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 17:231-235.
26. Van-Steensel B, Smogorzewska A and De Lange T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-413.
27. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, and De Lange T. (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
28. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, and De Lange T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20, 1659-1668.
29. Bailey SM, Cornforth MN, Kurimasa A, Chen DJ, Goodwin EH. (2001) Strand-specific post-replicative processing of mammalian telomeres. *Science* 293:2462-2465.
30. Stansel RM, de Lange T and Griffith JD. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J* 20:5532-5540.
31. Li GZ, Eller MS, Firoozabadi R, Puri N and Gilchrest, BA. (2003) Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence *Proc Natl Acad Sci* 100 (2): 527-53.
32. Smogorzewska A and De Lange T. (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 21: 4338-4348.
33. Baumann P and Cech TR. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292:1171-1175.
34. Baumann P, Podell E and Cech TR. (2002). Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol* 22: 8079-8087.

35. Kim SH, Kaminker P and Campisi J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. **Nat Genet** 23: 405-412.
36. Smith S, Giriati I, Schmitt A and De Lange T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at humantelomeres. **Science** 282: 1484-1487.
37. Smith S, and De Lange T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. **Curr Biol** 10:1299-1302.
38. Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebarjadian Y, Funk WD, Morin GB, Yaswen P and Campisi J. (2001): TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. **J Biol Chem** 276:35891-35899.
39. Li B, Oestreich S, and De Lange T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. **Cell** 101:471-483.
40. Zhou XZ and Lu KP. (2001) The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. **Cell**. 107: 347-359.
41. Wu G, Lee WH and Chen PL. (2000) NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternativelengthening of telomeres. **J Biol Chem** 275: 30618-30622.
42. Zhu H, Fu W and Mattson MP. (2000) The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis. **J Neurochem** 75:117-124.
43. Bryan, TM, Englezou A, Dalla-Pozza, L, Dunham MA and Reddel, RR. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. **Nature Med.** 3:1271–1274
44. De Vita, VT. 1997 Molecular biology of cancer: Oncogenes. En: Cancer: principles and practice of Oncology. Philadelphia:
45. Lewin B. 2001. Oncogenes y cáncer. En Genes VII. Marbán SL: España. Pp 875-906
46. Instituto Nacional del cáncer de Estados Unidos. <http://cancernet.nci.nih.gov>.
47. Secretaría de Salud. Tumores. Perfiles Estadísticos No. 7. Series Monográficas. México, 1991. www.salud.gob.mx
48. Secretaría de Salud. Epidemiología. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1994.
49. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J. 1992 Cancer Incidence in Five Continents. Volume VI. International Agency for research on Cancer (WHO). Scientific Publications 120. Lyon
50. INEGI/Secretaría de Salud. Principales causas de mortalidad en mujeres 2001. www.salud.gob.mx
51. INEGI/Secretaría de Salud Tasa de mortalidad (estandarizada por edad) por grandes grupos de causas, según sexo y entidad federativa de residencia habitual. 2001. www.salud.gob.mx

52. Wright D, Manos M. (1990). Sample preparation from paraffin embedded tissues. En PCR protocols. A guide to methods and applications. Editado por innis M, Gelfand M, Sninsky J and White T. Academic Press. Pp153-158
53. Bryan T, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S and Reddel R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. EMBO J 14: 4220-4248.
54. Sambrook B, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor
55. Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche)