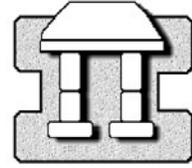




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



IZTACALA

**“ ESTUDIO DE LA PERDIDA DE HETEROCIGOSIDAD
EN TEJIDO NEOPLASICO DE MAMA, DE CINCO
MUJERES MEXICANAS ”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO
P R E S E N T A:
BENJAMIN ANTONIO RODRIGUEZ ESPINO

ASESOR:
DR. DIEGO J. 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.

Dedicado a:

Ma. Antonia De Los Santos Díaz †

Carmen Espino De Los Santos

*Gracias, por demostrarme
que lo único que no se puede lograr
es lo que no se desea...*

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó del segundo semestre de 2002, al primer semestre de 2003 en el Lab. de Genética Molecular del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI. Quiero agradecer al Dr. Diego J. Arenas Aranda por darme la oportunidad de formarme dentro del campo de la Biología Molecular.

Parte de este proyecto se realizó en el Lab. de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana. Quiero extender mi agradecimiento al Dr. Manuel Ramos Kurí por todas las facilidades brindadas y particularmente al M. en C. Francisco J. Estrada Mena por su apoyo incondicional y paciencia.

De igual forma quiero agradecer profundamente el apoyo incondicional y cariño de mi compañera de toda la vida la Biol. Adriana Sánchez Boiso, con quien he compartido todo lo bueno y malo durante la licenciatura.

Quiero agradecer el tiempo invertido en la revisión de este escrito y todas sus sugerencias a la M. en C. María Eugenia Heres Pulido, la M. en C. María de Jesús Laura Castañeda Partida, la M. en C. Irma Elena Dueñas García y el Dr. Sergio Vaca Pacheco.

INDICE

Agradecimientos.

Índice.

Resumen.

| | |
|--|----|
| I. Introducción | 6 |
| II. Antecedentes | 8 |
| 2.1 Características clínico-patológicas del cáncer de mama..... | 8 |
| 2.2 Evolución genética del cáncer | 9 |
| 2.3 Proto-oncogenes..... | 11 |
| 2.4 Genes supresores de tumores..... | 12 |
| 2.5 Genética del cáncer de mama..... | 13 |
| 2.5.1 Genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> | 14 |
| 2.5.2 Síndrome de Li-Fraumeni | 14 |
| 2.5.3 Síndrome de Cowden | 15 |
| 2.5.4 Ataxia telangiectasia..... | 15 |
| 2.5.5 Síndrome de Peutz-Jeghers | 16 |
| 2.6 Pérdida de heterocigosidad en el cáncer de mama..... | 16 |
| III. Objetivo general | 21 |
| 3.1 Objetivos particulares | 21 |
| IV. Material y Métodos | 22 |
| 4.1 Material Biológico | 22 |
| 4.2 Extracción del ADN genómico..... | 22 |
| 4.2.1 Extracción del ADN genómico de tejido en fresco | 22 |
| 4.2.2 Extracción del ADN genómico de tejido en parafina..... | 23 |
| 4.3 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN..... | 24 |
| 4.4 Evaluación de la integridad del ADN mediante electroforesis..... | 25 |
| 4.5 Selección de los microsatélites..... | 26 |
| 4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 27 |
| 4.7 Análisis de PDH en un secuenciador automático | 28 |

| | |
|--|----|
| V. Resultados | 30 |
| 5.1 Cuantificación e integridad del ADN..... | 30 |
| 5.2 Microsatélites..... | 31 |
| 5.3 Amplificación por PCR..... | 31 |
| 5.4 Análisis de PDH | 33 |
| VI. Discusión y Conclusión..... | 34 |
| 6.1 Material biológico..... | 34 |
| 6.2 Extracción de ADN genómico | 34 |
| 6.3 Microsatélites..... | 35 |
| 6.4 Análisis de PDH | 35 |
| Referencias..... | 46 |

RESUMEN

Durante la progresión tumoral en el cáncer se acumulan mutaciones en los genes reguladores del desarrollo, proliferación y reparación del ADN (proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación). La inactivación de alelos en genes supresores de tumor por pérdida de heterocigosidad (PDH) representa el tipo de mutación más frecuente en tumores primarios de mama. El objetivo del trabajo fue: Determinar la pérdida de heterocigosidad de los loci que contienen a los genes: NOEY2/ARHI, GSTM1, RASSF1A, DBC2/RHOBTB2, ATM, BRCA2, E2F4, TP53, BCPR y BRCA1 en tejido neoplásico de mama de cinco mujeres mexicanas y relacionar los resultados con las características clínico-patológicas de los tumores. Las pacientes cuya edad se encontraba entre los 41 y 65 años presentaron carcinoma ductal (con estadios IIA, IIIA y IIB con metástasis en ganglio). Los resultados mostraron la PDH de NOEY2/ARHI en 2 muestras de tejido, RASSF1A en 2, DBC2/RHOBTB2 en 1, ATM en 3, BRCA2 en 3, E2F4 en 3, TP53 en 2, BCPR en 2, BRCA1 en 4 y GSTM1 no se encontró mutado en ninguna paciente. Debido al tipo de mutaciones, el estadio en que se encuentran los tumores y la importancia de estos genes tanto en el control de la proliferación y en la reparación del ADN, sugiere que estos se encuentran involucrados de forma directa en muchos de los casos de la progresión del cáncer de mama.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cáncer de mama se considera la segunda causa de mortalidad femenina por neoplasias malignas en México después del cáncer cervical-uterino. De acuerdo a registros de la Secretaría de Salud (2002), durante los años 2000 y 2001 este padecimiento llegó a tasas de mortalidad de 6.8 y 7.0 por cada 100 mil habitantes respectivamente, lo que representó la muerte de poco más de 7,000 mujeres a nivel nacional en estos dos años. En este mismo período se registraron tasas anuales de incidencia de 3.7 y 3.9 por cada 100 mil habitantes que representaron un total de 6,845 mujeres con diagnóstico establecido de cáncer. En referencia al año 2002 aún no se encontraban definidas las cifras de mortalidad pero, en relación a incidencias se tenían hasta el mes de noviembre de ese año un total de 4,067 casos nuevos (DGE /SSA, 2002).

La incidencia y mortalidad por cáncer de mama se incrementan conforme a la edad de la mujer, lo que implica una mayor vulnerabilidad de aquellas entre los 35 a 44 años, pues de acuerdo a la Secretaría de Salud (2002) a partir de este rango de edad se presenta un aumento considerable de la mortalidad, que se mantiene creciente hasta los 64 años. Si se considera el predominio de la población adulta durante los próximos 50 años, como lo establecen las proyecciones referentes a la estructura poblacional por edades de nuestro país (CONAPO, 1999), también se puede asumir un aumento en aquellos grupos de mujeres con edades de mayor riesgo para este cáncer. Por lo que el cáncer de mama puede llegar a un nivel equivalente o mayor al del cáncer cervical-uterino convirtiéndose en la primera causa de mortalidad femenina en México.

La etiología del cáncer de mama es muy heterogénea porque además del sexo y la edad existen otros factores importantes que pueden predisponer al desarrollo de este padecimiento. De acuerdo a la Sociedad Americana del Cáncer (ACS, *American Society of Cancer*) cada factor puede representar de manera individual un grado de riesgo relativo para las personas expuestas (ASC, 2003):

- Factores con riesgo >4.0: edad (>40 años), mutaciones genéticas heredadas relacionadas con el cáncer de mama (*BRCA1* o *BRCA2*), dos o más grados iniciales con diagnóstico de cáncer de mama a una edad temprana, historia familiar, densidad de la mama (posmenopáusica).
- Factores con riesgo relativo de 2.1 - 4.0: un grado relativo previo con cáncer de mama, biopsia confirmada de hiperplasia atípica, altas dosis de radiación en el pecho, alta densidad ósea (posmenopáusica).

- Factores reproductivos con riesgo relativo de 1.1 - 2.0: edad tardía al primer parto (>30 años), menarca temprana (<12 años), menopausia tardía (>55 años), ausencia de partos, no haber amamantado.
- Factores que afectan la circulación hormonal con riesgo relativo de 1.1 - 2.0: uso de anticonceptivos orales, uso de substitutos hormonales en terapias a largo plazo, obesidad (posmenopáusica).
- Otros factores con un riesgo relativo de 1.1 - 2.0: historia personal de cáncer en el endometrio, ovarios o colon, el consumo de alcohol, estatura elevada, estatus socioeconómico alto, herencia judía.

Sin embargo, la misma institución indica que estos riesgos relativos sólo sirven como una comparación porque no proporcionan información sobre el valor de riesgo absoluto experimentado de manera grupal.

Los avances en las diversas técnicas de la Citogenética y la Biología Molecular han ayudado a comprender en parte la etiología del cáncer de mama. Sin embargo, estos conocimientos aún se encuentran limitados en torno a la evolución genética de la enfermedad. Por lo que son importantes los estudios relacionados con las alteraciones genéticas que se producen en las diferentes etapas del cáncer. El presente trabajo se enfocó al estudio de la pérdida de heterocigosidad en *loci* correspondientes a regiones de repetidos de dinucleótidos (microsatélites) adyacentes a la posición de genes supresores de tumor. Se piensa que este tipo de alteraciones genéticas pueden producir ciertos "perfiles" o patrones de pérdida, distintivos durante la progresión del cáncer que podrían determinarse y ser empleados como marcadores moleculares que complementen tanto al diagnóstico como al pronóstico de la enfermedad y favorezcan la elección del tratamiento más adecuado.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características clínico-patológicas del cáncer de mama

El cáncer de mama se desarrolla a partir de tumores en el tejido epitelial mamario. Este tejido se encuentra constituido por glándulas secretoras de leche denominadas lóbulos y por conductos, que conectan a los lóbulos con la areola mamaria. El resto de la mama se forma de tejido graso, conectivo y linfático. Existen diferentes tipos de cáncer que corresponden al lugar donde se originan (ACS, 2003, AJCC, 1997) los más frecuentes son: el carcinoma ductal que se origina a partir de las células que revisten a los conductos y el carcinoma lobulillar que se genera a partir de las células glandulares secretoras de leche. Si el tumor presenta proyecciones que han traspasado la lamina basal extendiéndose hacia los tejidos adyacentes se considera como cáncer infiltrante o invasor. Si se encuentra confinado a los conductos o lóbulos donde se originó se considera no infiltrante o in situ.

Muchos de los tumores son de tipo benigno, es decir, un crecimiento anormal de células en una área bien delimitada, con apariencia y comportamiento similar al tejido sano, que no se propagará más allá de su lugar de origen, por lo que no comprometerá la vida de la persona (ACS, 2003). Los tumores malignos en cambio, pueden invadir al tejido circundante y separarse de su lugar de origen ingresando al torrente sanguíneo o al sistema linfático induciendo con ello una metástasis. Cuando esto sucede, las células cancerosas frecuentemente tienen una primera estancia en los ganglios linfáticos de la axila y de ahí se diseminan hacia otros ganglios linfáticos, huesos, hígado o pulmones (ACS, 2003; AJCC, 1997).

En la actualidad, uno de los factores con mayor importancia tanto para el diagnóstico como para el pronóstico del cáncer de mama es la clasificación de la etapa o estadio en el que se encuentre el tumor (AJCC, 1997). El sistema de clasificación empleado se denomina TNM y se basa en el tamaño del tumor (T), la región linfática comprometida por el nudo tumoral (N) y la distancia de la metástasis (M). Cada uno de los estadios ya diagnosticado, supone una tasa de supervivencia relativa a 5 años para la persona: Estadio 0 (in situ) del 100%, estadio I del 98%, estadios IIA y IIB del 88% y 76% respectivamente, estadios IIIA y IIIB del 56% y 49% respectivamente y estadio IV del 16%.

Por otra parte, en el área de la histoquímica las pruebas de detección para los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PgR) son ampliamente usadas en la selección del tratamiento de la

enfermedad. Además, la presencia de estos dos receptores sugiere una alta probabilidad de respuesta a la terapia de hormonas y han sido asociados con un pronóstico favorable. Los biomarcadores, como: Erb-B2, EGF, p53, BCL2, Ki-67 son otro tipo de indicadores usados para definir el pronóstico y seleccionar el tratamiento del cáncer (Dickson y Lippman, 1997; Osin y Lakhani, 1999).

2.2 Evolución genética del cáncer

El cáncer es el resultado de la selección natural en las células de un organismo que han experimentado y acumulado alteraciones en su material genético. A partir de estudios en el cáncer colon-rectal, Vogelstein y Kinzler (1998) han propuesto un mecanismo de evolución de "pasos múltiples" para el desarrollo del cáncer. En este modelo, el tejido normal del epitelio evoluciona gradualmente a diferentes estadios de un adenoma hasta finalizar como un carcinoma invasor (Figura 1). También sugieren que son necesarias de tres a siete mutaciones para llevar al desarrollo de un tumor. En la forma hereditaria, la persona porta alguna mutación que le hace susceptible al padecimiento y las otras mutaciones necesarias para la inducción tumoral surgirán en el tejido blanco específico. Vogelstein y Kinzler señalan que cuando se renueva una población celular en particular, el número de células se mantiene constante por la salvaguarda de un gen que es específico para el tejido implicado. De manera que las mutaciones en estos genes, a los que han denominado "*gatekeepers*" (porteros o guardabarreras) rompen con el balance establecido entre la división y la muerte celular de una manera permanente. Por el contrario, si el *gatekeeper* funciona apropiadamente las mutaciones en otros genes no llegarán a tener un efecto negativo a largo plazo (Vogelstein y Kinzler, 1998).

Los genes supresores de tumor que se han identificado en los cánceres hereditarios se consideran los *gatekeepers* para el tejido involucrado. La razón de que un gen ampliamente expresado deba ser el *gatekeeper* para sólo un tipo celular, probablemente se encuentre en la compleja red de interacciones establecida entre el ambiente celular interno y el externo. En el caso de los cánceres que no presentan una versión hereditaria, es posible que se encuentre implicado más de un gen *gatekeeper* (Vogelstein y Kinzler, 1998).

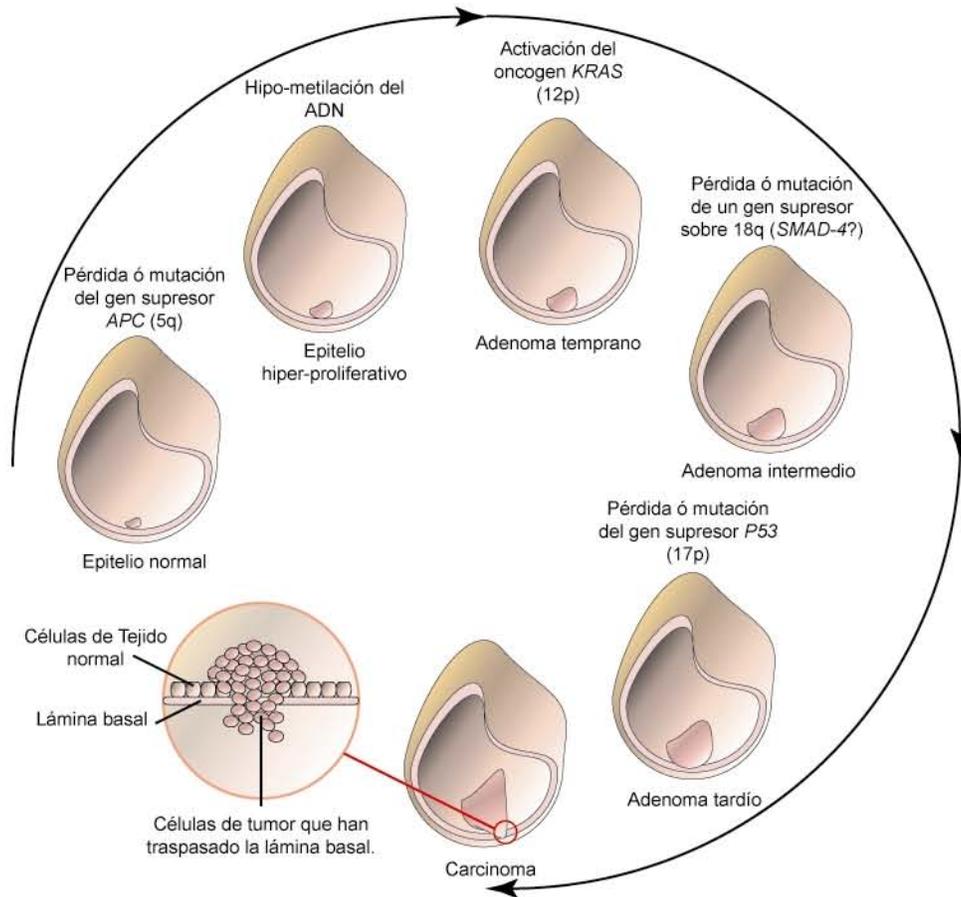


Figura 1. Modelo de evolución de múltiples pasos del cáncer (Vogelstein y Kinzler, 1998). En el cáncer colorrectal una mutación en el gen supresor de tumor *APC* promueve la división de una célula de epitelio normal hasta formar una masa tumoral benigna. Mutaciones posteriores inducen la activación del oncogen *KRAS* y la pérdida de los genes supresores de tumor *SMAD-4* y *TP53* llevando la masa tumoral por los diferentes estadios de un adenoma. Una vez que la progenie celular es portadora de las cuatro mutaciones el tumor se torna maligno y continúa su división celular hasta romper la lámina basal que rodea al tejido transformando.

Las alteraciones genéticas en las células tumorales convergen en seis cambios que son característicos (Hanahan y Weinberg, 2000; Ponder, 2001):

- La autosuficiencia de señales de crecimiento.
- La insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento.
- La evasión de la muerte celular programada o apoptosis.
- Un ilimitable potencial replicativo.
- La capacidad de invasión de tejidos.
- La capacidad de metástasis.

Gran parte de las características se relacionan con eventos genéticos de dos tipos principales. Aquellos en los que existe la ganancia de alguna función involucrando la activación de algún proto-oncogen y aquellos eventos en donde se produce la pérdida de la función en algún gen supresor de tumor (Callahan *et al.*, 1992; Dickson y Lippman, 1997).

2.3 Proto-oncogenes

Los proto-oncogenes se encuentran involucrados en el control positivo del desarrollo y proliferación celular. Las proteínas codificadas por estos genes pueden clasificarse de acuerdo a su función en: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y factores de transcripción (Dickson y Lippman, 1997; Vogelstein y Kinzler, 1998). A la fecha se han identificado alrededor de 100 proto-oncogenes que pueden ser activados a oncogenes, mediante mutaciones puntuales, alteraciones estructurales o amplificaciones. En el cáncer de mama se conocen al menos tres amplificaciones importantes en la línea germinal de los proto-oncogenes (Callahan *et al.*, 1992; Dickson y Lippman, 1997).

La amplificación que se observa con mayor frecuencia es en la banda cromosómica 8q24 que hospeda al gen *c-MYC*, cuyo producto se encuentra relacionado con el oncogen retroviral *v-myc*. El gen *c-MYC* fue descubierto a finales de los 70's y desde entonces se ha documentado su papel central en la proliferación y transformación maligna de las células humanas y animales (Liao y Dickson, 2000). Se ha reportado la amplificación o sobre-expresión de este gen en la mayoría de los cánceres humanos, no obstante la frecuencia de estas alteraciones varía ampliamente entre los diferentes reportes. En años recientes, se ha demostrado que este gen regula el crecimiento tanto en el sentido del tamaño celular, como en el contexto de la diferenciación de tejidos (Liao y Dickson, 2000). Además se sabe que *c-MYC* participa en muchas funciones celulares como la replicación,

crecimiento, metabolismo, diferenciación y apoptosis pero aún no han sido completamente elucidadas.

La región 17q12 es otra de las amplificaciones importantes que se presentan en el cáncer de mama, donde se aloja el gen *ERBB2 (HER-2/NEU)* miembro de la familia de receptores de los factores de crecimiento epidérmico. Este gen se ha encontrado sobre-expresado en aproximadamente 20 a 30% de los cánceres de mama invasivos de alto grado y ha sido empleado como un marcador de pronóstico y respuesta a terapias antiestrógenos y quimioterapias (Osin y Lakhani, 1999).

La región 11q13 donde se localiza el gen de la *ciclina D₁* se encuentra amplificada en aproximadamente 20% de los carcinoma de mama en humanos, pero la proteína se encuentra sobre-expresada en un 50% en el mismo tipo de tumores. Esta puede ser detectada en estadios tan tempranos como el carcinoma ductal *in situ*, pero no en lesiones premalignas. Una vez adquirida la sobre-expresión de la *ciclina D₁* ésta se mantiene en todos los estadios, incluso en las lesiones metastásicas. La relación de este gen en la formación tumoral de mama ha sido comprobada mediante modelos experimentales con ratones a los que se les ha inducido su sobre-expresión en el tejido mamario, llevando eventualmente a la formación del cáncer (Yu *et al.*, 2001).

2.4 Genes supresores de tumor

Los genes supresores de tumor son reguladores negativos del desarrollo y proliferación celular. La participación de estos genes dentro de la génesis tumoral fue inicialmente propuesta por A. Knudson en 1971 (Knudson, 1989; Callahan *et al.*, 1992) quien se apoyó en estudios epidemiológicos relacionados con la agrupación por edad de la enfermedad del retinoblastoma. En su hipótesis del "doble hit" (Figura 2), Knudson sugiere que la inactivación de ambos alelos del gen *RB1* responsable del padecimiento es necesaria para llevar a la formación del cáncer. En la forma hereditaria, la persona porta un alelo mutado de alguno de los progenitores que le producirá una predisposición al cáncer y sólo se requerirá de una segunda mutación de tipo somático en el alelo silvestre restante para desarrollar la enfermedad. En la forma esporádica se necesitan dos mutaciones de tipo somático para llevar a la pérdida de la función en el gen. Posteriormente, este modelo fue usado para tratar de explicar el desarrollo de otros tipos de cánceres hereditarios (Knudson, 1989; Callahan *et al.*, 1992; Dickson y Lippman, 1997; Vogelstein y Kinzler, 1998).

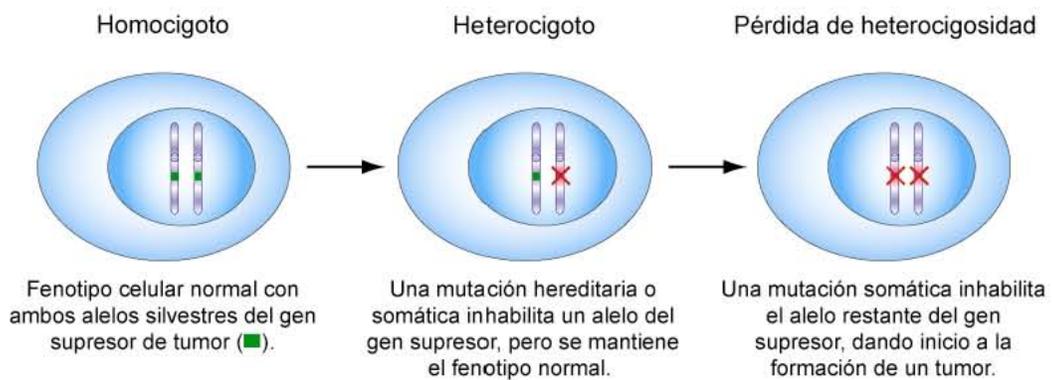


Figura 2. Modelo del "doble hit" para la formación del cáncer (Knudson, 1989). El modelo sugiere que el primer evento en la formación de un tumor es una mutación germinal o somática en uno de los alelos silvestres de un gen supresor de tumor. Posteriormente una segunda mutación ("doble hit") de tipo somático inhabilita el alelo restante del gen supresor de tumor y da lugar a la formación del tumor. En el caso del cáncer familiar la primera mutación es heredada de uno de los progenitores, mientras que en el cancer esporádico ambas mutaciones son de tipo somático.

El alelo silvestre puede ser inactivado por diversos mecanismos, como las mutaciones puntuales, la pérdida de la región cromosómica, la pérdida de un cromosoma con la duplicación de otro mutado, la alteración del gen mediante reordenamientos estructurales, la recombinación mitótica o las microdeleciones. La pérdida de la región cromosómica o pérdida de heterocigosidad (PDH), representa el tipo de mutación más frecuente en los tumores primarios de mama y sugiere la presencia de un gen supresor de tumor, dentro de la región afectada en el cromosoma homólogo (Knudson, 1989; Callahan *et al.*, 1992).

2.5 Genética del cáncer de mama

Diversas técnicas moleculares han proporcionado la capacidad de localizar y caracterizar algunas de las regiones cromosómicas que se encuentran alteradas con mayor frecuencia en el cáncer de mama además de identificar a los genes involucrados. Gran parte de los casos en cáncer de mama son de tipo esporádico y se han observado en personas que no cuentan con una historia familiar de la enfermedad. Sin embargo, se han logrado identificar ciertos genes y síndromes hereditarios que confieren una predisposición a la enfermedad, además de otros genes relacionados con su progresión, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes y síndromes relacionados con la predisposición y la progresión al cáncer de mama.

| Genes y síndromes relacionados con la predisposición al cáncer de mama. | | | |
|---|--------------|---|--|
| Gen | <i>locus</i> | Enfermedad | |
| <i>BRCA1</i> | 17q21 | Cánceres familiares femeninos de mama y ovario. | |
| <i>BRCA2</i> | 13q12.3 | Cánceres familiares de mama femenino y masculino. | |
| <i>TP53</i> | 17p13.1 | Síndrome de Li-Fraumeni. | |
| <i>PTEN</i> | 10q23 | Síndrome de Cowden. | |
| <i>ATM</i> | 11q23.1 | Ataxia telangiectasia. | |
| <i>LKB1/STK11</i> | 19p13.3 | Síndrome de Peutz-Jeghers. | |
| Genes relacionados con la progresión en el cáncer de mama. | | | |
| Gen | <i>locus</i> | Clase | Función |
| <i>ERBB2</i> | 17q12 | Oncogen | Receptor de factores de crecimiento. |
| <i>c-MYC</i> | 8q24 | Oncogen | Regulador del ciclo y muerte celular. |
| <i>Ciclina D₁</i> | 11q13 | Oncogen | Regulador de G ₁ en el ciclo celular. |
| <i>RB1</i> | 13q14.3 | Supresor de tumores | Regulador de G ₁ en el ciclo celular. |
| <i>TP53</i> | 17p13.1 | Supresor de tumores | Regulador del ciclo y muerte celular y reparación del ADN. |

Callahan *et al.*, 1991; Vogelstein y Kinzler, 1992; Dickson y Lippman, 1997; Stankovic *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Broeks *et al.*, 1998; Connolly *et al.*, 2000; Liao y Dickson, 2000; Welch y King, 2001; Eng, 2003.

2.5.1 Genes *BRCA1* y *BRCA2*

En 1990 se logró el mapeo mediante ligación genética del gen *BRCA1* en el cromosoma 17q12. Pronto se encontró una susceptibilidad hereditaria muy semejante entre las familias ligadas que presentaban casos múltiples de cánceres de mama y de ovarios. Las mutaciones en el gen *BRCA1* son responsables de la enfermedad en el 45% de las familias con casos sólo de cáncer de mama y en más del 90% de las familias con cánceres tanto de mama como de ovarios. El gen *BRCA1* fue aislado por métodos de clonación posicional y se encontró que comprendía 24 exones que codificaban para una proteína de 1,863 aminoácidos (Dickson y Lippman, 1997).

Posteriormente, se aisló al gen *BRCA2* considerado como el segundo gen más importante de susceptibilidad para el cáncer de mama (Tabla 1). Este gen se ubicó en el cromosoma 13q12.3 mediante estudios de ligación genética en 15 familias con múltiples casos de cáncer de mama, que no tenían ningún vínculo con el gen *BRCA1*. Las mutaciones en *BRCA2*, se presentan en cerca de 35% de las familias con cáncer de mama y también están asociadas con cánceres de mama masculinos, de ovarios, de próstata y pancreáticos. El gen cuenta con 27 exones que codifican para una proteína de 3,148 aminoácidos (Dickson y Lippman, 1997).

Tanto *BRCA1* como *BRCA2* presentan un comportamiento semejante a genes supresores de tumor con la pérdida del alelo silvestre en las muestras tumorales. Se ha señalado que los productos proteínicos de ambos genes interactúan con la proteína RAD51 y otras proteínas conocidas que están involucradas en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*) del ADN. La pérdida de la función en mecanismos de reparación permite la acumulación de mutaciones adicionales y finalmente la inducción tumoral (Scully y Livingstone, 2000; Welcsh y King, 2001).

2.5.2 Síndrome de Li-Fraumeni

El cáncer de mama también se encuentra dentro del grupo de enfermedades que constituyen al síndrome de Li-Fraumeni, en este síndrome se presentan 50% de mutaciones en la línea germinal del gen *TP53*. La enfermedad se caracteriza por presentar casos de cáncer de mama posmenopáusico en combinación con sarcomas infantiles, tumores cerebrales y carcinomas adrenocorticales. Los tumores tienden a presentarse tanto en la infancia como en la madurez y con frecuencia aparecen múltiples tumores primarios en un mismo individuo (Guízar-Vázquez, 2001).

El gen *TP53* se localiza en el cromosoma 17p13.1 y codifica una proteína nuclear que se une a secuencias específicas del ADN. Posee una función, como regulador negativo del crecimiento

y proliferación celular en situaciones de daño al ADN. Como respuesta al daño, la proteína *p53* detiene a la célula en la fase G₁ del ciclo celular, permitiendo a los mecanismos de reparación proceder antes de que continúe la síntesis del ADN. Esta proteína también es un componente activo de la muerte celular programada o apoptosis. Se considera que la inactivación del gen *TP53* o la disrupción de su producto proteico permite la persistencia del ADN dañado y el posible desarrollo de células tumorales (Vogelstein y Kinzler, 1998).

2.5.3 Síndrome de Cowden

El síndrome de Cowden se caracteriza por una demasía en cánceres de mama, tumores malignos gastrointestinales y enfermedades de la tiroides tanto benignas, como malignas. Como en otras formas hereditarias, el cáncer de mama se presenta a edades tempranas y también puede ser bilateral. La presencia de múltiples manifestaciones anormales en la piel (triquilemomas faciales múltiples, fibromas orales y papilomas, queratosis acral, palmar y plantar), pueden confirmar la correspondencia con este síndrome (Guízar-Vázquez, 2001).

Las mutaciones en la línea germinal del gen *PTEN* localizado en el cromosoma 10q23 son las responsables de este síndrome. El gen codifica una proteína tirosina fosfatasa que es homóloga a la tensina. La alta proporción de la pérdida de heterocigosidad en el *locus* de este gen sugiere que se trata de un supresor de tumor y se le ha relacionado con el control de la proliferación celular. La pérdida de *PTEN* se presenta durante la génesis tumoral tardía y se sospecha que interviene como una molécula reguladora de la función citoesquelética (Eng, 2003).

Aun cuando *PTEN*, se presenta alterado en una pequeña fracción de los cánceres de mama hereditarios, la caracterización de su función proporcionó un valioso hallazgo en la rutas de señalización y mantenimiento de la fisiología celular normal.

2.5.4 Ataxia telangiectasia

La ataxia telangiectasia es un desorden autosómico recesivo caracterizado por deterioro neurológico, estados de inmunodeficiencia, hipersensibilidad a radiación ionizante y telangiectasias. Los afectados por este padecimiento normalmente no toleran la radiación terapéutica que se suministra a otros pacientes con cáncer, por lo que requieren de un tratamiento especial. La mayoría de los afectados son homocigotos para el gen *ATM* y tienen un alto riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer particularmente leucemias.

Se han identificado más de 200 mutaciones en el gen *ATM* que se localiza en el cromosoma 11q23.1 y la mayoría de estas producen el truncamiento de la proteína. La proteína codificada por el gen pertenece a la familia de cinasas PI3/PI4. Es una proteína que funciona como regulador para una amplia variedad de proteínas corriente abajo incluyendo supresores de tumor como p53 y BRCA1, proteínas de puntos de control como CHK2, RAD17, RAD9 y la proteína de reparación NBS1. ATM y la cinasa análoga ATR se consideran controles maestros en las rutas de señalización, en puntos de control del ciclo celular requeridos para la respuesta al daño del ADN y para la estabilidad genómica (Stankovic *et al.*, 1998; Broeks *et al.*, 1998).

2.5.5 Síndrome de Peutz-Jeghers

El síndrome de Peutz-Jeghers es un desorden autosómico dominante que se caracteriza por pigmentación mucocutánea, poliposis hamartomatosa y tumores benignos y malignos en el tracto gastrointestinal, mama, ovario, cérvix y testículo. Las mutaciones en la línea germinal del gen *LKB1* localizado en el cromosoma 19p13.3 son las responsables en este síndrome.

El gen codifica para una cinasa serina-treonina también conocida como STK11. Se considera a *LKB1* como un gen supresor de tumor pues se ha comprobado su pérdida en varios tumores mediante marcadores moleculares. Se ha reportado que las mujeres con este síndrome presentan un incremento de hasta 20 veces en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y de ovario (Choi *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2000).

2.6 Pérdida de heterocigosidad en el cáncer de mama

De acuerdo al modelo de Knudson el primer evento en la formación de un tumor es una mutación en uno de los alelos silvestres de un gen supresor específico para el cáncer, que en la forma hereditaria se presenta en la línea germinal. El segundo "hit" será consecuencia de una mutación somática que lleve a la inactivación funcional de la copia restante del gen. Frecuentemente el segundo "hit" es el resultado de una gran deleción de material cromosómico, que también es conocida como pérdida de heterocigosidad (PDH) que se deriva de una recombinación aberrante o una disyunción incompleta. El modelo también sugiere que las tasas frecuentes de pérdida en un *loci* cromosómico en un cáncer específico pueden representar la presencia de un gen supresor de tumor en la región perdida (Knudson, 1989). Para identificar y determinar la posición de genes (mapear) que han sido inactivados por PDH varios estudios se han apoyado en la presencia de polimorfismos presentes a lo largo del genoma, como los llamados de longitud del fragmento de restricción (RFLP's), los

repetidos en tándem de número variable (VNTR's) o los repetidos cortos en tándem (STR's). La PDH empleando STR's o microsatélites puede ser detectada de forma directa mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*). Para esto se requiere amplificar el *loci* correspondiente tanto en las células de tejido tumoral, como en las células de tejido normal de un mismo individuo. Posteriormente, se comparan los productos obtenidos de cada alelo en el tejido tumoral contra sus equivalentes en el tejido normal (Osborne y Hamshere, 2000).

Si un individuo es heterocigoto para cierto *loci* la PDH de éste en células tumorales, puede sugerir que en el *loci* se encuentra un gen implicado en la formación o progresión del cáncer. En la actualidad, se sabe que las regiones cromosómicas donde se localizan los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *Rb1*, *ATM* y *LKB1/STK11* (Tabla 1) son frecuentemente afectadas por PDH tanto en la formación como en la progresión tumoral del cáncer de mama. Además, se han reportado otras regiones y genes que sufren este tipo de alteraciones pero con menor frecuencia, sin embargo no dejan de ser importantes para la comprensión de la enfermedad. También se han realizado proyectos con el fin de integrar a todas estas regiones conocidas en una base de datos conjunta, para identificar las regiones mínimas perdidas por delección que se involucran en la formación de tumores en el cáncer de mama (Osborne y Hamshere, 2000). Por la importancia de las alteraciones por PDH en el cáncer de mama, en el presente estudio se proponen 10 *loci* ligados a genes que son considerados como supresores de tumor o bien con esta función reguladora putativa.

Tabla 2. *Loci* seleccionados para el estudio de PDH en cáncer de mama. Se anexa la clave de registro de OMIM, en donde se puede complementar la información acerca de cada uno de los locus y genes citados.

| <i>Loci</i> | Genes | Descripción de los genes asociados | Referencia |
|-------------|--------------------------------|--|---|
| 1p31 | <i>NOEY2/ARHI</i> | Gen miembro de la superfamilia <i>RAS</i> , se expresa en células epiteliales normales de mama y ovario, pero no en tejidos cancerosos. Es un gen con impronta materna y su función se asocia con la inhibición del crecimiento celular. | Yu <i>et al.</i> , 1999. |
| 1p13.3 | <i>GSTM1</i> | La función de proteínas codificadas por este gen actúan como desintoxicadores de componentes electrofílicos incluyendo: carcinógenos, drogas terapéuticas, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo por conjugación con glutatión. Las mutaciones que anulan a este grupo de genes se encuentran ligadas con el incremento en un gran número de cánceres, como resultado del aumento en la susceptibilidad a toxinas y carcinógenos ambientales. | Zhong <i>et al.</i> , 1993. |
| 3p21.3 | <i>RASSF1A</i> | La proteína codificada es similar a las efectoras de <i>RAS</i> . La pérdida de este gen o la disfunción de su proteína se han asociado con la génesis tumoral de una amplia variedad de cánceres lo que sugiere su función como gen supresor de tumores. | Shivakumar <i>et al.</i> 2002. |
| 8p21.2 | <i>DBC2/</i> <i>RHOBTB2</i> | Es un candidato a gen supresor de tumores frecuentemente perdido en cáncer de mama. Contiene dominios altamente conservados de <i>RAS</i> y dos proteínas putativas que interactúan con su dominio. El gen se localiza en el epicentro de la región 8p21 que se pierde en el 3.5% de los tumores de mama. | Hamaguchi <i>et al.</i> , 2002. |
| 11q22-q23 | <i>ATM</i> | La proteína codificada pertenece a la familia de la cinasa P13/P14. Esta constituye un punto de control importante en el ciclo celular por fosforilación, por ello actúa como regulador para una amplia variedad de proteínas corriente abajo, que incluyen a las supresoras de tumores p53, BRCA1, los puntos de revisión de la cinasa CHK2, las proteínas RAD17 y RAD9 y la proteína NBS1 de reparación de ADN. Se piensa que la proteína de ATM y su homóloga ATR, son controles maestros de las rutas de señalización del ciclo celular y son requeridas para la respuesta al daño en el ADN, así como para la estabilidad genómica. | Broeks <i>et al.</i> , 2000; Stankovic <i>et al.</i> , 1998. |
| 13q12.3 | <i>BRCA2</i> | Al igual que con <i>BRCA1</i> , las mutaciones en este gen se han ligado con un elevado riesgo de cánceres de mama tempranos. La similitud y funcionalidad de las proteínas BRCA1 y BRCA2, sugiere que la función de estas se encuentra dentro de la misma ruta génica. Ambas tienen un potencial de activación transcripcional y se encuentran asociadas con la activación del sistema de reparación por rompimiento del ADN y/o recombinación de homólogos. Se ha demostrado que las dos proteínas coexisten y se localizan en un mismo complejo bioquímico. | Welsh y King, 2001. |
| 16q21-q22 | <i>E2F4</i> | La proteína codificada es un miembro de la familia de factores de transcripción <i>E2F</i> . Esta familia tiene un papel crucial en el control del ciclo celular, la acción de sus proteínas como supresoras pueden ser blanco de proteínas transformantes de virus de ADN en tumores pequeños. Incluye dominios de unión al ADN, un dominio de dimerización que determina su interacción con las proteínas de factores de transcripción regulados de la diferenciación celular, un dominio de | Ho <i>et al.</i> , 2001. |

| <i>Loci</i> | Genes | Descripción de los genes asociados | Referencia |
|-------------|--------------|---|---|
| | | transactivación enriquecido en aminoácidos ácidos y un dominio de asociación a proteínas supresoras de tumores que se encuentra contenido dentro del dominio de transactivación. La proteína tiene la capacidad de unirse a las tres proteínas supresoras de tumores <i>pRB</i> , <i>p107</i> y <i>p130</i> , pero presenta mayor afinidad por las dos últimas. | |
| 17p13.1 | <i>TP53</i> | La proteína <i>p53</i> tiene un papel esencial en la regulación del ciclo celular, particularmente en la transición de G0 a G1. En células normales esta se encuentra en niveles muy bajos, en tanto en líneas celulares transformadas se encuentra en cantidades muy altas, por lo que se cree contribuye a la transformación. <i>p53</i> es una proteína que contiene sitios de unión al ADN, dominios de activación de la transcripción y de oligomerización. Se sugiere que se une como tetrámero a sitios de unión de <i>p53</i> y activa la expresión de genes corriente abajo que inhiben el crecimiento y/o la invasión actuando como un gen supresor de tumores. Las mutaciones pueden ser tanto somáticas, como germinales en algunas familias con síndrome de Li-Fraumeni. | Vogelstein y Kinzler, 1998. |
| 17p13.3 | <i>BCPR</i> | La región 17p13.3 donde se localiza el gen telomérico <i>BCPR</i> , presenta una alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad en cánceres de mama (60%), esta región se localiza a una distancia relativamente cercana al gen <i>TP53</i> que se sitúa en 17p13.1. | Coles <i>et al.</i> , 1990; Stack <i>et al.</i> , 1995. |
| 17q21 | <i>BRCA1</i> | Tiene una función como gen supresor de tumores en células cancerosas de mama, es una fosfoproteína nuclear que se asocia con la holoenzima de la ARN polimerasa II. Las mutaciones en este gen producen el 45% del cáncer de mama hereditario y más del 80% de cáncer de ovarios hereditario. <i>BRCA1</i> puede servir de manera normal como un regulador negativo del crecimiento celular del epitelio mamario. Su relación con el cáncer de mama se debe a mutaciones directas sobre el gen o por alteraciones sobre su expresión. | Welch y King, 2001. |

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar la pérdida de heterocigosidad de los *loci* que contienen a los genes: *NOEY2/ARHI*, *GSTM1*, *RASSF1A*, *DBC2/RHOBTB2*, *ATM*, *BRCA2*, *E2F4*, *TP53*, *BCPR* y *BRCA1* en tejido neoplásico de mama de cinco mujeres mexicanas y relacionar los resultados con las características clínico-patológicas de los tumores.

3.1 Objetivos particulares

1. Realizar la búsqueda y selección de marcadores microsatelitales adyacentes a los *loci* propuestos.
2. Amplificar mediante PCR los marcadores microsatelitales seleccionados en muestras de ADN de tejido neoplásico y normal de mama.
3. Determinar la PDH de los marcadores amplificados y relacionar los resultados con los datos clínico-patológicos de las pacientes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Las muestras de tejido neoplásico y normal de mama, fueron proporcionadas por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de Zona No. 2 del IMSS. Correspondieron a cinco mujeres de nacionalidad mexicana, con diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer de mama, en estadios IIA, IIB y IIIA. Las pacientes no habían recibido tratamientos con quimioterapia o radioterapia. Dos de ellas contaban con antecedentes familiares de cáncer de mama.

Las muestras de tejido de una paciente se encontraban incluidas en parafina. Las muestras de las otras mujeres fueron proporcionadas como material en fresco. El tejido en fresco fue colocado en congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que se le realizó la extracción del ADN genómico. Entre las muestras de tejido en fresco se incluía una de tejido ganglionar de la axila adyacente con metástasis.

4.2 Extracción del ADN genómico

4.2.1 Extracción del ADN genómico de tejido en fresco

Para la extracción del ADN genómico del tejido en fresco se usó el método de extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989; Rapley, 2000):

Solución amortiguadora de digestión o lisis.

- 100 mM de NaCl.
- 10 mM de Tris-HCL, pH 8.0.
- 25 mM de EDTA, pH 8.0.
- 0.5% de SDS.
- 0.1 mg de proteinasa *K* por ml de solución de lisis.

Soluciones adicionales:

- Solución de fenol-cloroformo-isoamílico (25-24-1 v/v).
- Solución de acetato de amonio 7.5 M.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70%.

Procedimiento:

1. El tejido en fresco fue congelado con nitrógeno líquido a $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se cortó en pequeñas secciones.
2. Se pesaron de 200 a 1,000 mg del tejido y se pulverizaron en mortero con pistilo, previamente esterilizados y enfriados con nitrógeno líquido.

3. Se agregó 1.2 ml de solución de lisis por cada 100 mg del tejido.
4. La muestra se incubó de 12 a 18 hrs. a 50 °C, con agitación constante.
5. Se realizó la extracción con 1 volumen de solución de fenol-cloroformo-isoamílico.
6. Se centrifugó por 5 min. a 3,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se resuspendió con ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
7. Se centrifugó durante 3 min. a 15,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces más con etanol al 70%.
8. Se centrifugó durante 3 min. a 15,000 rpm. Se descartó el etanol y se permitió la evaporación del etanol residual.

La pastilla de ADN se resuspendió en 50 a 200 µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -30 °C.

4.2.2 Extracción del ADN genómico de tejido en parafina

Para la extracción del ADN genómico del tejido en parafina, se empleó un kit comercial para extracción de ácidos nucleicos Puregene[®] (<http://www.gentra.com/home.asp>):

Soluciones incluidas en el kit:

- Solución de lisis celular.
- Solución de precipitación de proteínas.
- Solución de hidratación de ADN.

Soluciones adicionales:

- Xileno.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70%.

Procedimiento:

1. Se removió el exceso de parafina de la muestra, se pesaron de 10 a 20 mg de tejido y se cortó finamente. Se colocó en un tubo de 1.5 ml y se agregaron 600 µl de xileno.
2. La mezcla se incubó 5 min. a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó durante 3 min. a 3,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces más con xileno.
3. Se agregaron 600 µl de etanol absoluto y se incubó 5 min. a temperatura ambiente, con agitación. Se centrifugó durante 3 min. a 3,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 4 a 5 veces más con etanol absoluto.
4. Se agregó 600 µl de la solución de lisis y se homogenizó por inversión durante 25 veces, se incubó durante 60 min. a 65 °C.
5. La mezcla se dejó templar a temperatura ambiente y se agregaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Se agitó durante 20 seg. hasta que se obtuvo una mezcla uniforme.

6. Se centrifugó durante 1 min. a 15,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 600 μ l de etanol absoluto. Se mezcló por inversión 50 veces.
7. Se centrifugó durante 5 min. a 15,000 rpm. Se descartó el etanol absoluto y se agregaron 600 μ l de etanol al 70%. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces más con etanol al 70%.
8. Se centrifugó durante 1 min. a 15,000 rpm. Se descartó el etanol y se permitió la evaporación del etanol residual.
9. La pastilla de ADN se resuspendió en 50 μ l de solución de hidratación y se incubó durante 1 hr. a 60 °C. El ADN se almacenó a -30 °C.

La concentración y pureza del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotometría con luz ultravioleta (UV) y la integridad de las moléculas por electroforesis en gel de agarosa.

4.3 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) requiere de concentraciones específicas de los ácidos nucleicos que se usarán como molde, además de un alto grado de pureza de las moléculas. Las moléculas de ADN y ARN tienen la propiedad de absorber la luz UV a una longitud de onda (λ) cercana a los 260 nm, que es el promedio de absorción aproximado de sus bases nucleotídicas (que van de 256 a 281 nm). Es posible calcular la concentración de los ácidos nucleicos presentes en una dilución acuosa mediante un espectrofotómetro de luz UV, porque ésta es directamente proporcional a la absorbancia de las moléculas a 260 nm (ABS_{260}) (Sambrook *et al.*, 1989; Rapley, 2000). Se evaluó la concentración y pureza del ADN extraído de los tejidos, usando las siguientes equivalencias:

- 1 Densidad óptica (DO) a $ABS_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml}$ de ADN de doble cadena.
- 1 DO a $ABS_{260} \approx 20 - 33 \mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena sencilla.
- 1 DO a $ABS_{260} \approx 40 \mu\text{g/ml}$ de ARN

Procedimiento:

1. En una celdilla de 100 μ l se agregó agua bidestilada y se calibró la absorbancia del espectrofotómetro en cero, empleando la lámpara de luz UV a una $\lambda = 260$ nm.
2. En otra celdilla se agregaron 2 μ l del ADN extraído más 98 μ l de agua bidestilada y se homogenizó (dilución 1:50).
3. La celdilla se colocó en el aparato y se tomaron las lecturas de las ABS_{260} y ABS_{280} .

4. Con estas lecturas, la concentración se calculó de la siguiente forma:

$$ABS_{260} \times 50 \text{ (DO del ADN a } ABS_{260}) \times 50 \text{ (Factor de dilución)} = \mu\text{g /ml ADN}$$

5. El índice de pureza se calculó con el coeficiente de la relación ABS_{260} / ABS_{280} .

4.4 Evaluación de la integridad del ADN mediante electroforesis

Durante el proceso de extracción el ADN es sometido a fuerzas que afectan a la integridad de la cadena. La fragmentación excesiva de ésta puede influir de manera negativa en el proceso de amplificación por PCR, por lo que es importante evaluar la integridad de las moléculas mediante electroforesis en gel de agarosa. El método consiste en el corrimiento de la muestra de ADN a través de una matriz porosa formada por polímeros de agarosa (gel de agarosa). El gel de agarosa se coloca en una cámara de electroforesis y se sumerge en una solución amortiguadora con pH neutro, a la que se aplica una corriente eléctrica continua y el ADN (colocado en pequeños pozos en el gel) comienza a migrar en dirección al ánodo, debido a que posee una carga negativa facilitada por los grupos fosfato de las cadenas. Posteriormente el ADN se tiñe con una solución de bromuro de etidio (que se intercala en las cadenas) y es verificada por la fluorescencia emitida en presencia de luz UV (Sambrook *et al.*, 1989; Rapley, 2000). Se evaluó la integridad del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa, como sigue:

Solución amortiguadora de electroforesis TBE 1X.

Solución para 500 ml de TBE 5X (se diluyó 1:5 con agua bidestilada).

- Tris base 27.7 g
- Ác. Bórico 13.75 g
- EDTA 10 ml

Solución amortiguadora de carga.

- Azul de bromofenol* 0.25%
- Cianol-xileno FF* 0.25%
- Ficol 15 %

*El azul de bromofenol migra con fragmentos aproximados de 300 pb y el cianol-xileno con fragmentos aproximados de 4000 pb.

- Solución de bromuro de etidio a una concentración de 1mg /ml.
- Agarosa (grado molecular).
- Marcador de peso molecular *Lambda Hind III* (Invitogen ® <http://www.invitrogen.com/>)

Procedimiento:

1. Se fundió 1 g de agarosa en 100 ml de solución amortiguadora TBE 1X y se agregaron 4 μ l de la solución de bromuro de etidio.
2. La mezcla se vació en un molde con peine para formar pozos y se colocó en una cámara para electroforesis. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente.
3. Se agregó solución amortiguadora TBE 1X suficiente para sumergir al gel de agarosa aproximadamente 3 mm.
4. Se tomaron de 2 a 3 μ l del ADN extraído de la muestras de tejido y se mezclaron con 2 μ l de la solución amortiguadora de carga.
5. La mezcla se colocó cuidadosamente en uno de los pozos formados en el gel.
6. Se tomó 1 μ l del marcador de peso molecular y se procedió de la misma forma.
7. Una vez que se colocaron las muestras en los pozos, la cámara se conectó a una fuente de poder y se aplicó una corriente eléctrica de 70 voltios, durante 25 a 30 min. (el ánodo se orientó en contraposición a los pozos con el ADN).
8. El gel se extrajo de la cámara y se colocó en un trans-iluminador de luz UV. Se tomaron fotografías del gel y se evaluó la integridad de las muestras de ADN, comparándolas con el marcador de peso molecular.

4.5 Selección de los microsatélites

En el presente estudio se consultaron bases de datos públicas disponibles en Internet, para la selección de los marcadores microsatelitales ligados a las regiones cromosómicas de interés. Además de la posición en el genoma, los marcadores debían tener como característica principal, el mayor promedio de heterocigosidad posible para poder ser empleados en el análisis de PDH. Una vez que los marcadores fueron seleccionados, se buscó el registro de éstos en GeneBank para corroborar la información y facilitar su consulta. A continuación, se enlistan las bases de datos públicas consultadas en la búsqueda de los marcadores:

- Collaborative Mapping Group 1992, Baseline Maps / Copyright © 1995. Helen Donis-Keller Lab, Division of Human Molecular Genetics, Department of Surgery, Washington University, St.Louis, MO, USA. Fecha de consulta Nov. 2002.
<http://www.genlink.wustl.edu/basemaps/index.html>

- Genetic location database at Southampton University / Human Genetics Division, Duthie Building (Mailpoint 808), Southampton General Hospital, Tremona Road, Southampton, SO16 6YD, UK. Fecha de consulta Noviembre de 2002.
http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/
- National Center for Bioinformatics Human Transcript Map. P. Deloukas, A. Butler, C. Clee, T. Dibling, S. Gelling, L. Green, P. Harrison, R. Hocking, E. Holloway, S. Hunt, A. Mendis, A. Peck, D. Simon, C. Soderlund, R. Staples, D. Bentley, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Hinxton, Cambridge CB10 1SA UK. Fecha de consulta Noviembre de 2002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>
- RH mapping at Stanford Human Genome Center. Fecha de consulta Noviembre de 2002.
<http://www-shgc.stanford.edu/Mapping/index.html>
- The GDB Human Genome Database. Fecha de consulta Noviembre de 2002.
<http://www.gdb.org/>

Los oligonucleótidos específicos para cada marcador microsatelital, fueron sintetizados por Applied Biosystems®, en donde se solicitó se les aplicase un colorante fluorescente distintivo en el extremo 5' de uno de los oligonucleótidos (FAM®, HEX®, NED®), con la finalidad de poder analizar simultáneamente en un secuenciador automático, marcadores con alelos de tamaño similar sin empalme en las señales.

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR, consiste en la amplificación de un segmento específico de ADN por la enzima *Taq* ADN polimerasa. En la reacción, se produce la desnaturalización de la doble cadena del ADN y el alineamiento y extensión de dos oligonucleótidos que flanquean a la región blanco y que sirven de iniciadores (primers) para la enzima. Los tres pasos que constituyen un ciclo de PCR (desnaturalización, alineamiento y síntesis de ADN), se obtienen por la variación de la temperatura a partir del punto de fusión de las cadenas complementarias. La cadena sintetizada a partir de un primer, se extiende a través de la región complementaria del ADN y sirve como molde para el otro primer, que se extenderá en sentido opuesto en la reacción posterior. Después de varios ciclos de amplificación, se produce una acumulación exponencial de segmentos discretos de ADN que corresponden a la región blanco específica (Sambrook *et al.*, 1989; Rapley, 2000). Se amplificaron mediante PCR los microsatélites seleccionados con los siguientes reactivos y condiciones:

Soluciones:

- | | |
|--|--------------------|
| ▪ Solución amortiguadora | 1X |
| ▪ Cloruro de Magnesio | 1.5 mM |
| ▪ Dinucleótidos trifosfatados (dNTP's) | 0.2 mM \forall_u |
| ▪ <i>Taq Gold</i> Polimerasa® | 1 Unidades |
| ▪ ADN genómico | 20 ng |
| ▪ Primers | 5 pmol \forall_u |

Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μ l con agua desionizada estéril.

Parámetros de la PCR:

- | | |
|---------------------------|---------------|
| ▪ Activación de la enzima | 95 °C 10 min. |
| ▪ Desnaturalización* | 96 °C 10 seg. |
| ▪ Alineamiento* | 55 °C 30 seg. |
| ▪ Extensión* | 72 °C 3 min. |
| ▪ Extensión final | 72 °C 30 min. |

*30 ciclos para el ADN extraído de tejido en fresco y 45 ciclos para el de parafina.

4.7 Análisis de PDH en secuenciador automático

Como se indicó anteriormente, la PDH en un *loci* específico se detecta mediante la comparación del número de copias de los alelos en las células tumorales, contra el número de copias de los alelos en las células normales de un mismo individuo (Osborne y Hamshire, 2000). En un secuenciador automático los productos de PCR del *loci* de interés (ambos alelos), son desnaturalizados con calor y sometidos a electroforesis donde son separados por tamaño. El aparato emite un haz de luz láser que incide sobre las partículas fluorescentes con que son marcados los oligonucleótidos de ADN. La luz difractada es captada por un espectrógrafo que identifica a la molécula como un blanco de lectura y entonces el sistema comienza a calcular y registrar el número de bases de la cadena, así como el número de copias con el mismo marcador y tamaño. Una vez que se ha completado la electroforesis y la lectura, los datos registrados para ambos tipos celulares pueden ser comparados. En este proyecto se empleó un sistema de secuenciación automatizada por capilares *ABI Prism 310* de PE Applied Biosystems® en conjunto con el programa GeneScan 2.1®, para establecer el tamaño y número de copias de los alelos correspondientes a los microsatélites seleccionados (Tabla 4). Se emplearon los programas Genotyper 2.5® y MSI/LOH Assay® para realizar el análisis de

PDH, estos usan los datos producidos por GeneScan 2.1® y generan electroferogramas que muestran el estado de los alelos en las muestras de tejido (Figura 3), aplicando la siguiente fórmula para comprobar si existió la pérdida del alelo silvestre (Perkin-Elmer Corporation, 1998):

$$PDH = \frac{\frac{\text{Altura del alelo 2 normal}}{\text{Altura del alelo 1 normal}}}{\frac{\text{Altura del alelo 2 tumoral}}{\text{Altura del alelo 1 tumoral}}}$$

Un valor de $PDH \leq 0.67$ indicaría la pérdida del alelo, que es igual al 33% de disminución en el número de copias (altura del pico) de uno de los alelos tumorales en comparación con el alelo normal. Es esencial que los microsatélites empleados para el análisis sean heterocigotos en la persona, porque de otra forma no existiría un punto de referencia para la comparación (Perkin-Elmer Corporation, 1998).

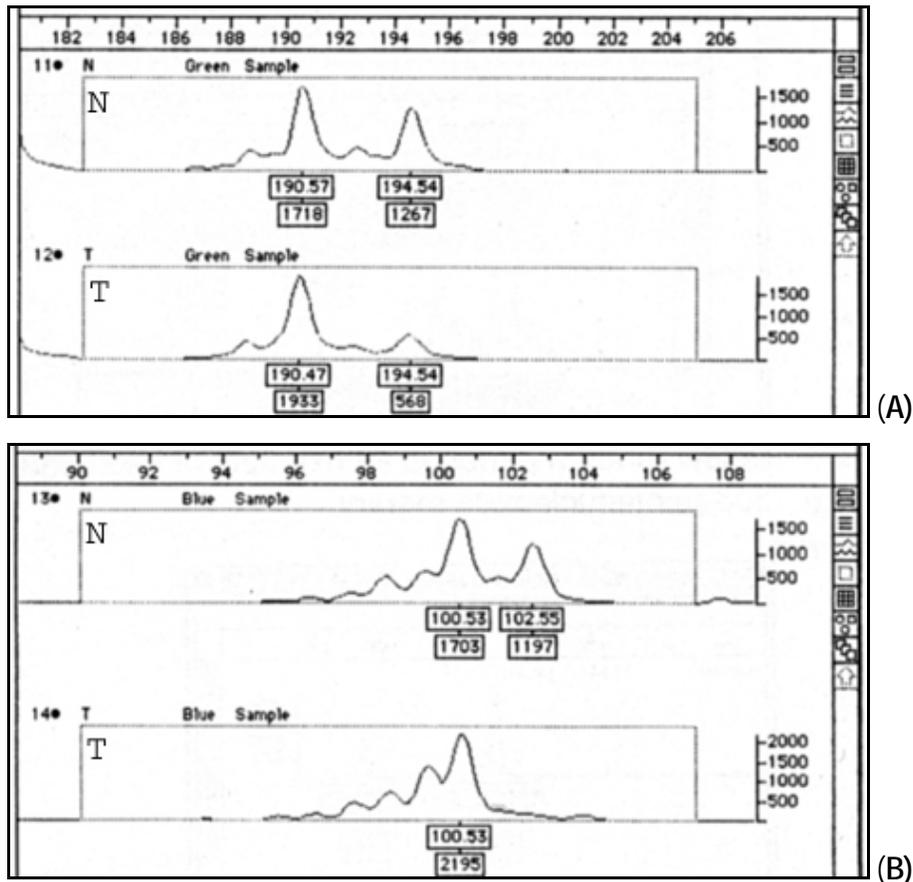


Figura 3. Electroferogramas generados por MSI/LOH Assay®, donde se muestra la PDH de los alelos en el panel inferior de ambas figuras. Para el análisis los picos de mayor altura (número de copias) se consideran como el alelo 1 en ambos tipos de tejido: Tumoral (T) y Normal (N). En (A) se observan copias en menor cantidad del alelo 2 tumoral, lo que podría sugerir un posible estado de heterogeneidad para ese loci entre las células tumorales. En (B) se ha perdido completamente el alelo 2 de la muestra tumoral, lo que ilustra una clara PDH para ese loci.

V. RESULTADOS

5.1 Material biológico

Tabla 3. Datos de las pacientes y características de los tumores.

| | Pacientes | | | | |
|-------------------|--------------------|--|------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Tipo de tumor | Carcinoma ductal | Carcinoma ductal y Metástasis de Ganglio | Carcinoma ductal | Carcinoma ductal | Carcinoma ductal |
| Estadio | IIA | IIB | IIIA | IIA | IIA |
| Edad | 52 | 60 | 65 | 59 | 41 |
| <i>ER</i> | Hiperestrogenismo | Normal | Normal | ¿? | ¿? |
| Historia familiar | Si | No | Si | No | No |
| Tipo de muestra | Tejido en parafina | Tejido en fresco | Tejido en fresco | Tejido en fresco | Tejido en fresco |

5.2 Cuantificación e integridad del ADN

Las concentraciones de ADN obtenidas de los tejidos en fresco se encontraron entre los 100 y 150 ng/ μ l (\approx 20 a 30 μ g totales por cada 200 mg). La concentración del ADN extraído de tejido en parafina fue aproximada a 80 ng/ μ l (\approx 5 μ g totales por cada 20 mg). Sólo se consideraron muestras con un índice de pureza superior a 1.8. Las muestras presentaban una ligera degradación (Figura 4).

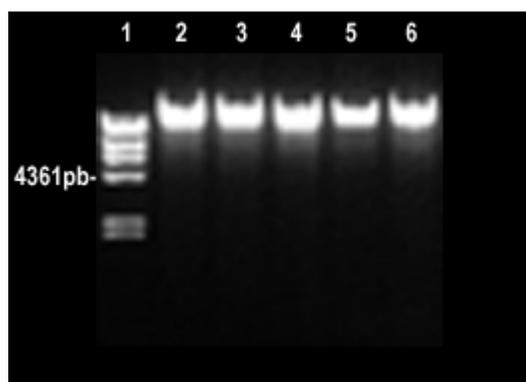


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con ADN de tejido normal de las 5 pacientes, extraído con un kit comercial (Puregene®). Carril (1) marcador de peso molecular λ *Hind III*; carril (2) paciente 2; (3) paciente 3; (4) paciente 4; (5) paciente 1 y (6) paciente 5.

5.3 Microsatélites

Tabla 4. Descripción de los 12 marcadores microsatelitales seleccionados para el estudio de PDH.

| Marcador | Genebank | Loci | Repetidos | Alelos | % Heterocigosidad | Secuencia de los oligonucleótidos | Colorante |
|----------|----------|---------|-----------|--------|-------------------|--|-----------|
| D1S197 | Z16522 | 1p31.2 | CA | 6 | 80 | 5'- TCATGTCCCTCCTCCCAAAG -3' 5'- GAGCAAGCATCCAAAAACGA -3' | HEX |
| D1S2627 | Z52171 | 1p13.3 | CA | 8 | 73 | 5'- CACTTGAACCCTGGGAG -3' 5'- GACATTCTGATGGACAGCAC -3' | HEX |
| D3S2338 | Z51546 | 3p21.3 | CA | 9 | 86 | 5'- GAAGCCAGCAGTTTCTC -3' 5'- CTGTATTGTTTTCCAGGATAAG -3' | FAM |
| D8S550 | Z24258 | 8p21.3 | CA | 12 | 86 | 5'- CAGGAGTCAATAACCCAAAGTCAT-3' 5'- TGGCACATCCCGAAGTC-3' | FAM |
| D11S4127 | Z52988 | 11q22.2 | CA | 7 | 71 | 5'- ATGAGAAGTGCCATCCAGC-3' 5'- ACTATGCCCAGTGTGTGTGC-3' | NED |
| D13S1247 | Z52659 | 13q13.2 | CA | 7 | 80 | 5'- TTCCTCAATGTCTTGACAGTT-3' 5'- TCTTCAGCATTGGCTCTAT-3' | HEX |
| D16S515 | Z24558 | 16q21.2 | CA | 11 | 80 | 5'- CATTCTGAAATTAGACAGCGATAGG -3' 5'- TGTGACCAGAGGCTTGC -3' | NED |
| D16S3106 | Z53781 | 16q21 | CA | 7 | 73 | 5'- GAGACCTACAGTCTTTTGCATTAC-3' 5'- TTTTGAAGCTGAGCAGAAGG-3' | HEX |
| D17S1353 | Z50920 | 17p13.1 | CA | 10 | 87 | 5'- CTGAGGCACGAGAATTGCAC-3' 5'- TACTATTCAGCCCAGGTGC-3' | FAM |
| D17S1866 | Z54044 | 17p13.3 | CA | 14 | 80 | 5'- TGGATTCTGTAGTCCCAGG-3' 5'- GGTTCAAAGACAACCTCCC-3' | NED |
| D17S1827 | Z53076 | 17q21.3 | CA | 10 | 82 | 5'- GTGAGTGGAGATTGCACC-3' 5'- CACTGGGCTAAGGCTGT-3' | NED |
| D17S1814 | Z52854 | 17q21.2 | CA | 7 | 78 | 5'- TCCCAATGACGGTGATG-3' 5'- CTGGAGGTTGGCTTGTGGAT-3' | FAM |

5.4 Amplificación por PCR

Los marcadores se amplificaron mediante PCR empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los productos de amplificación, utilizando un marcador de peso molecular de 50pb (Figura 4).

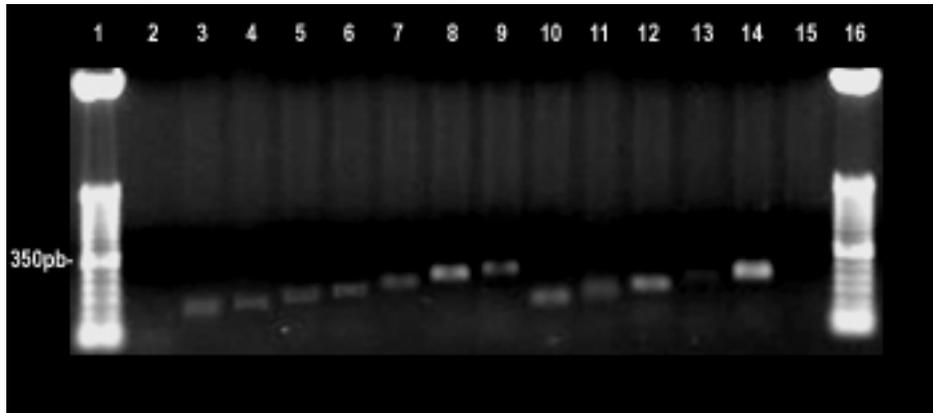


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los productos amplificados de los marcadores de la paciente 1. Carril (1) y (16) marcador de peso molecular de 50 pb ladder; (2) control negativo; (3) D1S197; (4) D1S2627; (5) D3S2338; (6) D8S550; (7) D11S4127; (8) D13S1247; (9) D16S515; (10) D16S3106; (11) D17S1353; (12) D17S1866; (13) D17S1827 y (14) D17S1814.

5.5 Análisis de PDH

Tabla 5. Resultados del análisis de PDH de los marcadores microsatelitales de cada paciente. N =normal, PDH =pérdida.

| Marcador | Genes asociados | Pacientes | | | | | |
|----------|---------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 2 G | 3 | 4 | 5 |
| D1S197 | <i>NOEY2/ARHI</i> | N | PDH | PDH | N | N | N |
| D1S2627 | <i>GSTM1</i> | N | N | N | N | N | N |
| D3S2338 | <i>RASSF1A</i> | N | N | PDH | PDH | N | N |
| D8S550 | <i>DBC2/RHOBTB2</i> | N | N | N | PDH | N | N |
| D11S4127 | <i>ATM</i> | N | PDH | PDH | PDH | N | N |
| D13S1247 | <i>BRCA2</i> | N | PDH | PDH | PDH | N | N |
| D16S515 | <i>E2F4</i> | N | N | PDH | PDH | N | N |
| D16S3106 | <i>E2F4</i> | PDH | N | N | N | N | N |
| D17S1353 | <i>TP53</i> | N | PDH | N | N | PDH | N |
| D17S1866 | <i>BCPR</i> | PDH | N | N | PDH | N | N |
| D17S1814 | <i>BRCA1</i> | N | N | N | PDH | PDH | PDH |
| D17S1827 | <i>BRCA1</i> | PDH | N | N | PDH | N | N |

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Material biológico

La edad de las mujeres se encontró dentro del rango de mayor incidencia y mortalidad establecidos por la Secretaría de Salud (2002) para México y la ACS (2003) para la Unión Americana. De acuerdo a este último organismo también se encontraban dentro del mayor índice de riesgo relativo (>4) para el desarrollo de la enfermedad. Las pacientes 1 y 3 (Tabla 3) con 52 y 65 años de edad respectivamente contaban con antecedentes familiares de cáncer de mama, pero se incluyeron en el estudio porque se considera que el cáncer de mama resultado de alteraciones hereditarias por lo general inicia a una edad más temprana (ACS, 2003). La posibilidad de conocer los altos niveles de receptores de estrógeno (*ER*) en la paciente 1, sugieren que el cáncer no se encontró asociado con alguna mutación hereditaria en *BRCA1*, debido a que la presencia de este marcador es expresado en niveles bajos en cánceres hereditarios asociados con este gen (Osin y Lakhani, 1999). De manera contraria, en el cáncer asociado a mutaciones hereditarias en *BRCA2* los niveles de *ER* son similares a los del cáncer de tipo esporádico. La paciente 1 en particular no presentó PDH en la región de *BRCA2*.

Extracción del ADN genómico

El tipo de preservación de la muestra de tejido afectó directamente en la calidad del ADN extraído. De las muestras de tejido en fresco a las que se extrajo el ADN con fenol-cloroformo-isoamílico, se obtuvo una concentración por arriba de los 100 ng/μl con un índice de pureza cercano a 2.0. La mayor parte del material presentó una degradación baja, que es recomendable para la mayoría de los métodos en Biología Molecular. Por otra parte, en la extracción de ADN de las muestras incluidas en parafina la concentración resultaba por debajo de 40 ng/μl o incluso la recuperación de los ácidos nucleicos era nula, del igual forma la pureza y degradación resultaban deficientes. Por esto se optó por hacer la extracción usando un kit comercial (Puregen®) con el que se obtuvo una notable mejoría en la concentración que se aproximó a los 80 ng/μl. Además la pureza alcanzó un índice aceptable mayor a 1.8, sin embargo se percibía un ligero barrido en el gel producto de la degradación. Pero fue posible amplificar por PCR cada uno de los marcadores sin mayor problema.

Microsatélites

Algunos de los microsatélites presentaban un registro ambiguo entre las bases de datos citadas. La información y la posición de los marcadores era variable entre cada base de datos, por lo que se decidió verificar la información además en GeneBank. En esta base de datos los marcadores también presentaban registros variables a la base de procedencia, pero era posible encontrar los pseudónimos para cada microsatélite, lo que fue de gran ayuda para corroborar la posición y relación con los genes de interés.

Análisis de PDH

Un aspecto sobresaliente de los genes *ATM*, *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2* es que sus proteínas están involucradas en una ruta molecular común, que es la relacionada con la respuesta al daño producido por el rompimiento de la doble cadena del ADN (*DSB, double-strand DNA break*). La proteína ATM es un checkpoint sensible al daño en la cadena de ADN que se activa después de ocurrir algún DSB inducido por radiación ionizante o algún otro tipo de agente que induce estos rompimientos. La proteína p53 actúa corriente abajo de ATM, es fosforilada y consecuentemente “disparada” iniciando una respuesta protectora que bloquea al ciclo celular, dando tiempo a la reparación del daño o que induce la apoptosis en células genéticamente dañadas. Alternativamente las proteínas BRCA1 y BRCA2 pueden trabajar en conjunto con la proteína Rad51, la cual ayuda en la reparación del DSB (Hoeijmakers, 2001).

De acuerdo a Ding y col. (2004) las mutaciones en las secuencias de los genes *ATM*, *TP53* y *BRCA1* son raras en el cáncer de mama esporádico, sin embargo la PDH en los *loci* que contienen a estos tres genes son relativamente frecuentes. Además, los autores mencionan que entre mayor sea el grado o nivel tumoral se incrementa la frecuencia de la expresión anormal de las tres proteínas, particularmente de *BRCA1* lo que resulta en una pobre diferenciación del tejido neoplásico. La paciente 2 presentó la PDH de *ATM* tanto en la muestra tumoral como en la metástasis, lo que sugiere que fue un evento temprano en la formación del tumor. Por otra parte, también presentó la PDH de *TP53* pero sólo en el tejido tumoral, lo que sugiere que la pérdida fue posterior a la metástasis y que en la clona original se generó una heterogeneidad genómica que derivó a metástasis con la posterior acumulación de mutaciones de forma independiente. La paciente 3 presentó la PDH de *ATM*, *TP53* y *BRCA1* y debido a la importancia de estos genes para mantener la estabilidad genómica (Ding *et al.*, 2004), se sugiere que la pérdida de estos fue un

evento temprano que resultó en el gran número de mutaciones acumuladas en el tejido tumoral de esta mujer.

El *loci* de *BRCA1* flanqueado por los marcadores D17S1814 y D17S1827 presentó PDH en las muestras de tumor de 4 pacientes (80%). La distancia que existe entre los dos marcadores es de 4.65 cM que representa el tamaño mínimo de la pérdida en la paciente 3 quien perdió ambos marcadores. De acuerdo a Welch y King (2001), las regiones de *BRCA1* y *BRCA2* contienen una alta densidad de elementos repetitivos de ADN que pueden contribuir a su inestabilidad genética. En la región que constituye a *BRCA1* existe un 42% de secuencias repetitivas *Alu* (blancos para la enzima de restricción del mismo nombre) y un 5% más de otro tipo de repetidos. Las regiones ricas en secuencias *Alu* se asocian con genes implicados en los intercambios de regiones cromosómicas homólogas y no homólogas, por lo que de acuerdo a estos autores no sería raro que se encuentren alteraciones como pérdidas o reordenamientos dentro de las regiones de ambos genes. En este estudio se encontró que la paciente 2, quien no había perdido a *BRCA1* sí presentaba mutación en *BRCA2* tanto en la muestra de tumor como en la de metástasis. Esto concuerda con la propuesta tanto de Welch y King (2001) como de Ding y col. (2004), en relación a la frecuencia de las mutaciones en estas regiones, sin embargo se requiere analizar una mayor cantidad de muestras para corroborar la propuesta. Las células que carecen de *BRCA1* o *BRCA2* acumulan un gran número de mutaciones, debido a que estas proteínas forman parte de los sistemas de reparación por daño al ADN, particularmente en la recombinación de regiones homólogas cuando se produce algún rompimiento en ambas cadenas del ADN (Hoeijmakers, 2001; Welch y King, 2001 y Ding *et al.*, 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos inferir que en la paciente 2 ocurrieron al menos 3 mutaciones esporádicas previas a la metástasis en los genes *NOEY/AHRI*, *ATM* y *BRCA2* y posiblemente la falta de *BRCA2* se relacione con la pérdida de los genes *RASSF1A* y *E2F4* en la metástasis.

Yu y col. (1999), registraron la PDH del gen *NOEY/AHRI* en el 41% de los casos de un estudio con 49 muestras de cáncer de mama y ovario. La proteína codificada por este gen inhibe la señalización de *RAS* inducida por mitógenos para la liberación de factores de crecimiento, por lo que *NOEY/AHRI* resulta un buen candidato a gen supresor de tumor para este tipo de cánceres. Un aspecto relevante del gen es que presenta una impronta materna, por lo que una sola mutación en el alelo paterno llevaría a la pérdida de su expresión lo que facilitarse por la inactivación de algún

mecanismo de reparación, como en el que participa *BRCA2* (Yu *et al.*1999). Probablemente este sea el caso de la paciente 2 quien fue la única mujer en la que se encontró PDH en este *loci*.

En la región 3p21.3 se encuentra el gen *RASSF1A*, este *loci* fue reportado por Shivakumar y col. (2002) como una región de frecuente PDH durante la génesis tumoral de pulmón, mama, ovario, nasofaringe y riñón. En el presente estudio se encontró la PDH de esta región en el tejido correspondiente a metástasis ganglionar de la paciente 2 y en el tejido tumoral de la paciente 3, ambas con un estadio tumoral avanzado. Es probable que la pérdida de este *loci* haya contribuido en el incremento del número celular en ambas pacientes, debido a que *RASSF1A* es un inhibidor de la proliferación que regula el ciclo celular en la fase de transición de G1/S (Shivakumar *et al.*, 2002). El resultado de la paciente 2, contrasta con el señalamiento de los autores de que la PDH de esta región es más frecuente en las etapas iniciales del tumor. También señalan que la regulación del ciclo celular mediante *RASSF1A* se acompaña con la disminución de la ciclina D1, lo que resulta interesante debido a que la re-introducción de la expresión de *RASSF1* en las líneas celulares transformadas es suficiente para inhibir la tumorigenicidad de esas células. Si fuera posible detectar la pérdida del gen en etapas tempranas, así como los niveles de ciclina D₁ sería de gran utilidad tanto para el diagnóstico, como de posible indicador para terapia en los tumores primarios de mama.

El gen *E2F4* es un factor de transcripción que puede contribuir tanto a la proliferación celular como a la apoptosis dependiendo del tejido específico en el que sea expresado. En el estudio realizado por Ho y col. (2001) encontraron disminuida la expresión de este gen en 7 de 10 de muestras correspondientes a carcinomas primarios de mama y en el total de 10 muestras de tejido metastásico cuando fueron comparadas contra el tejido normal. En el presente estudio se observó la pérdida del marcador D16S515 para el gen *E2F4* en la muestra correspondiente al tejido metastásico de la paciente 2 y en el tejido tumoral de las pacientes 1 y 3, a pesar de este limitado número de muestras los resultados parecen ser concordantes con el estudio de Ho y col. (2001). De acuerdo a los autores, la pérdida de este inhibidor podría conferir una resistencia celular a la apoptosis sin tener efecto alguno sobre la tasa de proliferación celular y la síntesis del ADN. Por lo anterior se podría esperar que pudieran acumularse un mayor número de mutaciones en la progenie celular con la PDH de *E2F4*. Esto sumado a las mutaciones en *ATM*, *TP53* y *BRCA1* podría explicar el gran número de mutaciones halladas en la paciente 3, quien presenta un estadio relativamente avanzado sin haber desarrollado metástasis.

DBC2 fue propuesto como un gen supresor de tumores por Hamaguchi y col. (2002). En su artículo registran la PDH del *loci* en 7 de un total de 200 muestras (3.5 %) de tejido tumoral de mama. En el presente proyecto se observó la pérdida de esta región en la paciente 3, quien presentaba el estadio más avanzado (IIIA). Se sabe que el producto proteínico de *DCB2* es capaz de inhibir el crecimiento de células transformadas que carecen del transcrito. Aún cuando guarda homología con la proteína RAS y se sugiere que es un factor de transcripción, se desconoce cual o cuales son los blancos específicos de este producto proteico. Dado que no se encontraron mutaciones del gen en estadios más tempranos a IIIA, es posible que este se encuentre involucrado en la progresión tardía de los tumores, lamentablemente los autores no comentan acerca de los estadios que estudiaron de manera que no es posible inferir más sobre este gen en particular.

Trabajos previos han sugerido la existencia del gen supresor de tumor *BCPR* para cáncer de mama en 17p13.3 (Coles *et al.* 1990 y Stack *et al.* 1995), una región subtelomérica ubicada distalmente a 20 Mb de *TP53*. De acuerdo con ambos estudios es posible advertir la PDH de este *loci* hasta en el 60% de los casos esporádicos de cáncer de mama y de entre el 50% al 75% en el cancer de ovario. En el presente proyecto se observó la PDH de este *locus* en las pacientes 1 y 3 (con estadios IIA y IIIA respectivamente). Aún cuando ambas mujeres presentan estadios tumorales diferentes extrañamente ambas presentaban antecedentes familiares de cáncer de mama.

El gen *GSTM1* fue el único marcador que no presentó PDH en ninguna de las pacientes. Este gen supresor de tumor se ha ligado principalmente con la susceptibilidad a cáncer pulmonar y colón-rectal y en menor medida con cancer de mama (Zhong *et al.*, 1993). Lo anterior sumado al reducido número de pacientes podrían explicar que no fueran encontradas mutaciones en este gen.

Los datos de las pacientes, las características de los tumores y el análisis de PDH en los marcadores seleccionados, sugieren que los genes estudiados representaron un factor importante en la progresión tumoral de las mujeres. Sin embargo, es necesario incrementar el número de muestras en este tipo de estudios para definir la frecuencia de las mutaciones en diferentes estadios tumorales. Además es recomendable el emplear al menos 2 microsatélites por cada gen para tratar determinar con mayor precisión la región de la PDH.

En este proyecto se encontró que aquellas pacientes con estadios menos avanzados (IIA) presentaron un menor número de mutaciones, por el contrario las pacientes con estadios más evolucionados presentaron un mayor número de mutaciones en los genes estudiados, lo que resalta la gran importancia de los genes supresores de tumor y de reparación en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

REFERENCIAS

1. ACS, 2003. Breast cancer facts & figures 2003-2004. American Cancer Society, Atlanta, Georgia.
2. AJCC, 1997. Breast. En: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Pa. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia; pp. 171-180.
3. Broeks A., de Klein A., Floore AN., Muijtjens M., Kleijer WJ., Jaspers NG. y LJ. Veer, 1998. ATM germline mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population. *Hum Mutat.* 12:330-337.
4. Callahan R., Cropp CS., Merlo GR., Liscia DS., Cappa APM. y R. Lidereau, 1992. Somatic mutations and human breast cancer. *Cancer (Sup.)* 69:1582-1588.
5. Choi HS., Park YJ. y JG. Park, 1999. Peutz-Jeghers syndrome: a new understanding. *J Korean Med. Sci.* 14:2-7.
6. Coles C., Thompson AM., Elder PA., Cohen BB., Mackenzie IM., Cranston G., Chetty U., Mackay J., Macdonald M. y Y. Nakamura, 1990. Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. *Lancet* 336:761-763.
7. CONAPO, 1999. Envejecimiento demográfico en México: retos y perspectivas. Consejo Nacional de Población, México, DF.
8. Connolly DC., Katabuchi H., Cliby WA. y KR. Cho, 2000. Somatic mutations in the STK11/LKB1 gene are uncommon in rare gynecological tumor types associated with Peutz-Jegher's syndrome. *Am J Pathol.* 156:339-345.
9. DGE /SSA, 2002. Enfermedades neoplásicas. *Epidemiología* 50(19):27.
10. Dickson RB. y ME. Lippman, 1997. Cancer: principles & practice of oncology. 5a ed. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia.
11. Ding SL, Sheu LF, Yu JC, Yang TL, Chen BF, Leu FJ y CY Shen, 2004. Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br. J. Cancer* 90:1995-2001.
12. Eng C., 2003. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat.* 22:183-198.
13. Guizar-Vázquez JJ., 2001. Genética clínica: diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Editorial Manual Moderno, México.
14. Hamaguchi M., Meth JL., Klitzing C., Wei W., Esposito D., Rodgers L., Walsh T., Welch P., King MC. y MH. Wigler, 2002. DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13647-13652.
15. Hanahan D. y RA. Weinberg, 2000. The hallmarks to cancer. *Cell* 100:57-70.
16. Ho GH., Calvano JE., Bisogna M., y KJ. van Zee, 2001. Expression of E2F-1 and E2F-4 is reduced in primary and metastatic breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 69:115-22.
17. Hoeijmakers JHJ., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
18. Jupe ER., Badgett AA., Neas BR., Craft MA., Mitchell DS., Resta R., Mulvihill JJ., Aston CE. y LF. Thompson, 2001. Single nucleotide polymorphism in prohibitin 39 untranslated region and breast-cancer susceptibility. *Lancet.* 357:1588-9.
19. Knudson AG., 1989. Hereditary cancers: clue to mechanism of carcinogenesis. *British J. Cancer* 59:661-666.
20. Liao DJ. y RB. Dickson, 2000. c-Myc in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 7:143-164.
21. Osborne RJ. y MG. Hamshire, 2000. A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res.* 60:3706-3712.
22. Osin PP. y SR. Lakhani, 1999. The pathology of familial breast cancer Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Research* 1:36-40.
23. Perkin-Elmer Corporation, 1998. MSI/LOH assay user's manual. Perkin-Elmer Corporation, California.
24. Ponder BAJ., 2001. Cancer genetics. *Nature* 411:336-341.
25. Rapley R., 2000. The nucleic acid protocols handbook. Humana Press, Nueva Jersey.
26. Sambrook B., Fritsch EF. y T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.

27. Sato T., Saito H., Swensen J., Olifant A., Wood C., Danner D., Sakamoto T., Takita K., Kasumi F. y Y. Miki, 1992. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 52:1643-1646.
28. Sato T., Sakamoto T., Takita K., Saito H., Okui K. y Y. Nakamura, 1993. The human prohibitin (PHB) gene family and its somatic mutations in human tumors. *Genomics* 17:762-4.
29. Scully R. y DM. Livingstone 2000. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408:429-432.
30. Secretaría de Salud. 2002. Mortalidad 2000. Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño. Consulta en Internet <http://www.ssa.gob.mx>.
31. Secretaría de Salud, 2002. Mortalidad 2001. Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño. Consulta en Internet <http://www.ssa.gob.mx>.
32. Shivakumar L., Minna J., Sakamaki T., Pestell R. y MA. White, 2002. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol. Cell. Biol.* 22:4309-4318.
33. Stack M., Jones D., White G., Liscia DS., Venesio T., Casey G., Crichton D., Varley J., Mitchell E. y J. Heighway, 1995. Detailed mapping and loss of heterozygosity analysis suggests a suppressor locus involved in sporadic breast cancer within a distal region of chromosome band 17p13.3. *Hum. Mol. Genet.* 4:2047-2055.
34. Stankovic T., Kidd AMJ., Sutcliffe A., McGuire GM., Robinson P., Weber P., Bedenham T., Bradwell AR., Easton DF., Lennox GG., Haites N., Byrd PJ. y AMR. Taylor, 1998. ATM Mutations and Phenotypes in Ataxia-Telangiectasia Families in the British Isles: Expression of Mutant ATM and the Risk of Leukemia, Lymphoma, and Breast Cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 62:334-345.
35. Vogelstein B. y KW. Kinzler, 1998. The genetic basis of human cancer. McGraw Hill, Nueva York.
36. Welch PL. y MC. King, 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10:705-713.
37. Yu Q., Geng Y. y P. Sicinski, 2001. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411:1017-1021.
38. Yu Y., Xu F., Peng H., Fang X., Zhao S., Li Y., Cuevas B., Kuo WL., Gray JW. Siciliano M., Mills GB. y RC. Bast, 1999. NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:214-219.
39. Zhong S., Wyllie AH., Barnes D., Wolf CR. y NK. Spurr, 1993. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 14:1821-1824.