



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.

EXPRESIÓN DE LOS GENES: FACTOR DE CRECIMIENTO
SEMEJANTE A INSULINA TIPO 1 Y 2 (IGF1 Y 2), RECEPTOR DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A INSULINA TIPO I (IGF-
IR), PROTEÍNA DE UNIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
SEMEJANTE A INSULINA TIPO 3 (IGFBP-3) Y PROTEÍNA DE
CHOQUE TÉRMICO (HSP70) EN PÁNCREAS DE PACIENTES CON
CÁNCER.

TESINA QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LA ESPECIALIZACIÓN
EN BIOQUÍMICA CLINICA.

PRESENTA

QFB. MARISOL HERNÁNDEZ ESQUIVEL

ASESOR DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS



MÉXICO, D.F.

2007.



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Departamento de Inmunología y Reumatología por permitirme desarrollar este proyecto de tesina.

A la Dra. Martha Menjívar Iraheta y al comité académico de la Especialización en Bioquímica Clínica por el apoyo otorgado; mediante la exención de pago para cursar los semestres 2006-II y 2007-I.

Al Dr. Francisco R. Villa del INCMN “Salvador Zubirán” por la asesoría brindada.

A los miembros del jurado asignado para la revisión del manuscrito de tesina, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A los compañeros del Laboratorio de Inmunología y Reumatología del INCMN “Salvador Zubirán”: Araceli, Teresa, Carlos, Diego, José Luis y Elizabeth por su agradable compañía y su ayuda durante la realización de esta tesina.

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras por su asesoría, paciencia, enseñanzas y sus agradables pláticas y compañía.

DEDICATORIAS

A mis padres : Martha Esquivel y Enrique Hernández a quienes agradezco su apoyo, cariño motivación para concluir este nuevo proyecto.

A mis hermanas: Martha Patricia, Arisbeth y Deisy por su cariño y consejos, se que siempre cuento con ustedes.

A mis sobrinos: Luisa Fernanda, Leonardo y Diego por hacer los fines de semana diferentes con su alegría.

A mis amigos de la Especialización en Bioquímica Clínica: Agustín, Virginia por su ayuda y compañía hicieron que los días de clases fueran más felices; en especial a Idaly por su invaluable amistad e incomparable carisma.

A mis amigos de la Facultad de Química: Ana Elizabeth, Magdalena, Nayeli y Fernando.

A mis compañeros y amigos de trabajo en la DGSM de la UNAM: Margarita C. Andrés, Sara y Laura R por sus buenos deseos.

A una gran amiga y compañera de trabajo Mirma Pérez Estrada por el cariño, comprensión y confianza que tienes en mi.

ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
IGF	Factor de crecimiento semejante a insulina.
IGF 1	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1
IGF 2	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 2.
IGFBP3	Proteína de unión del factor de crecimiento semejante a insulina.
IGF IR	Receptor del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1.
Kb	kilo bases.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
HSP	Proteína de choque térmico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
pb	Pares de bases.
mg	Miligramos
ml	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto.
μ L	Microlitro
H ₂ O	Agua.
°C	Grado centígrado.
A _{260/280}	Absorbancia a 260 y 280 nanómetros.
c DNA	DNA complementario
ng	nanogramos.
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Dinucleótidos trifosfatados.
mM	Milimolar.
Taqpol	Enzima Taq polimerasa.
V	Volts
UV	Luz ultravioleta
χ^2	Ji cuadrada.
PM	Marcador de peso molecular.

INDICE

	página
Abreviaturas.....	ii
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivo General.....	12
5.1 Objetivos Particulares.....	12
6. Materiales y Métodos	
6.1 Pacientes.....	13
6.2 Oligonucleótidos de los Genes Amplificados.....	14
6.3 Extracción de RNA total.....	14
6.4 Síntesis de cDNA mediante la reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR).....	15
6.5 Amplificación de los genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
7. RESULTADOS.....	19
8. DISCUSION.....	27
9. CONCLUSIONES.....	29
10. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Palabras clave: Cáncer pancreático, factor de crecimiento semejante a insulina , IGF, proteína de choque térmico HSP70, expresión relativa.

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades más complejas del ser humano. A pesar de los avances en los campos de la biología molecular y celular es todavía ampliamente discutido como las células neoplásicas progresan en la carcinogénesis y adquieren capacidad metastásica.

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) son mediadores importantes del crecimiento, desarrollo y sobrevivencia celular. Los IGF's pueden promover el progreso del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis ya sea interactuando directamente con otros factores de crecimiento o bien indirectamente con otros sistemas moleculares. La familia de proteínas de choque térmico HSP70 consiste de moléculas chaperonas que se pueden expresar constitutivamente, pero también son inducibles por estrés. El principal estrés inductor de la HSP70 es altamente expresado en el citosol y en la membrana plasmática de tumores primarios de varios orígenes.

Objetivo. Determinar la expresión relativa de los genes: IGF1 y 2, IGF IR, IGFBP3 y HSP70 en páncreas de pacientes con adenocarcinoma y pancreatitis.

Materiales y métodos. Utilizamos 52 muestras de tejido pancreático obtenido de biopsias de 24 hombres y 28 mujeres con edad promedio de 51.7 ± 18 años (intervalo de 17 a 83 años). Los grupos de pacientes fueron: 9 páncreas normales (GRUPO 1); 8 pacientes con pancreatitis crónica, 1 paciente con pseudoquiste pancreático y 1 paciente con quiste pancreático (GRUPO 2); 21 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pancreático (GRUPO 3) y 12 pacientes con diagnóstico de cáncer maligno no pancreático, los cuales tuvieron el siguiente diagnóstico: 1 paciente con cáncer de duodeno, 1 paciente con tumor papilar quístico, 8 pacientes con cáncer de ampulla de Vater, 1 paciente con cáncer de vías biliares intrahepáticas y 1 paciente con cáncer de vías biliares extrahepáticas (GRUPO 4). Diseñamos los iniciadores con el programa DNASTAR a partir de la secuencia reportada en Gen Bank del NCBI. Realizamos la extracción del RNA total por el método de tiocianato de guanidinio. Sintetizamos cDNA mediante RT-PCR. Realizamos la amplificación de los genes mediante PCR. Visualizamos los productos de las amplificaciones en geles de agarosa al 2.0 %

teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes obtenidas las capturamos con una cámara digital y las analizamos con el programa LabWorks versión 4.6.

Análisis estadístico. Se utilizamos el software SPSS versión 12 para Windows. Comparamos los resultados de expresión relativa en función del gen constitutivo GAPDH de los cuatro grupos de pacientes mediante la prueba U de Mann-Whitney. Comparamos la frecuencia de expresión de los genes IGF 2, IGF IR e IGFBP3 entre grupos con la prueba no paramétrica de χ^2 .

Resultados y discusión El resultado del análisis estadístico no mostró una diferencia significativa de la expresión relativa en función al gen constitutivo GAPDH entre los distintos grupos. Sin embargo, encontramos una tendencia en la expresión relativa de los genes IGF1 (p=0.053) e IGFBP3(p = 0.061) del grupo 1 (control normal) en el cual la expresión relativa del gen IGF1 fue mayor y la expresión relativa del gen IGFBP3 menor en comparación con el grupo 4 (cáncer maligno no pancreático).

El análisis de la frecuencia de expresión de los genes IGF2, IGF IR e IGFBP3 entre los distintos grupos no mostró diferencias significativas (valores de p >0 .05 en todos los casos). Los genes IGF2 e IGF IR no se expresaron en los páncreas de sujetos sanos. La expresión de estos genes en los pacientes con pancreatitis es indicativo de un aumento en la diferenciación y proliferación celular, lo cual puede predecir el desarrollo de un proceso neoplásico. La proteína de choque térmico HSP70 no mostró diferencias significativas en la expresión relativa del gen HSP70 entre grupos.

Conclusiones. El presente trabajo muestra una expresión diferencial de los genes IGF2, IGF IR, entre los grupos 1 (control normal) y los grupos 2 (pancreatitis crónica y quistes),3 (adenocarcinoma pancreático) y 4 (cáncer maligno no pancreático). Si bien las diferencias no fueron significativas, se observó una tendencia, lo cual muestra evidencia de que estos genes modulan la proliferación y diferenciación celular al igual que en otros análisis previamente descritos para: cáncer de próstata, hígado, pulmón, colon y seno. La expresión del gen IGF IR en pacientes con diagnóstico de carcinoma, lo ubica como candidato para su uso como posible blanco molecular para el tratamiento del cáncer.

2.- INTRODUCCIÓN.

El páncreas es una glándula en forma de hoja, localizada detrás del estómago; se divide anatómicamente en tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. La cola señala hacia el hígado y la cabeza esta anidada en el asa duodenal. El páncreas es una de las glándulas que tiene secreción externa e interna, las cuales están relacionadas con la digestión intestinal, así como el metabolismo de la glucosa .

La unidad de secreción exocrina está representada por el acino pancreático, en tanto que el islote de Langerhans representa a la unidad de secreción interna. Aproximadamente el 1% del tejido pancreático consiste de un grupo de células, los islotes de Langerhans, que producen hormonas endocrinas (Guyton y Hall, 2001). Los islotes se integran por 20-30% de células alfa, 60 –70% de células beta y del 2-8% por células delta.

Las células alfa producen glucagon, una hormona que incrementa la concentración de glucosa en plasma estimulando: la glucogenolisis, gluconeogénesis, lipólisis de tejido adiposo y movilizan los aminoácidos.

Las células beta sintetizan proinsulina, la cuál consiste de cadenas A, B y el péptido C. La insulina es almacenada en gránulos secretores y cuando la glucosa en plasma es alta, estos gránulos migran hacia la pared celular y son liberados por exocitosis. La insulina aumenta la captura de glucosa por el hígado, músculo y tejido adiposo, inhibe la gluconeogénesis, la degradación de proteínas, la movilización y la oxidación de los ácidos grasos, aumenta la

síntesis de RNA, la entrada de potasio, fosfato y magnesio a las células musculares y del hígado.

Las células delta es donde se produce somatostatina, la cuál inhibe la acción de la insulina y la gastrina, inhibe también la secreción exocrina de enzimas pancreáticas y disminuye el flujo biliar.

Las células F producen polipéptido pancreático, una hormona que estimula la secreción de enzimas pancreáticas e intestinales e inhibe la motilidad intestinal.

El páncreas produce al menos 22 enzimas digestivas, 15 de ellas son proteasas las cuáles actúan en las tres principales fuentes de energía: las proteínas digeridas por las enzimas tripsina y quimiotripsina y elastasa; los lípidos por las enzimas lipasa, fosfolipasa A₂ y colesterasa; y los carbohidratos complejos por la α -amilasa. Las unidades funcionales del páncreas exócrino consisten de un grupo de células acinares que almacenan la mayoría de las enzimas digestivas en gránulos, en forma de enzimas inactivas (zimogenos). Los gránulos son liberados de las células acinares por exocitosis hacia los conductos colectores y finalmente alcanzan el conducto pancreático (Kaplan, et. al. 2003).

CANCER PANCREÁTICO

El cáncer es una de las enfermedades más complejas del ser humano. A pesar de los avances en los campos de la biología molecular y celular es todavía ampliamente discutido como las células neoplásicas progresan en la carcinogénesis y adquieren capacidad metastásica.

El cáncer es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo entero, se origina a partir de la proliferación descontrolada de las células producida por una mutación o bien por una activación anormal de genes que controlan el ciclo celular (Sherr, 2004).

En el 2005 los tumores malignos; fueron la tercera causa de muerte en México. En mujeres 5.2 % y en hombres 4.9 % de las muertes por tumor maligno corresponden a cáncer pancreático (INEGI. Estadísticas vitales. Base de datos del 2005).

El adenocarcinoma pancreático es un tipo común fatal de cáncer; el pronóstico que se realiza es escaso y la detección temprana es de gran importancia.

Debido a que existe una gran variedad de tumores pancreáticos se ha propuesto clasificarlos como lo muestra la tabla 1.

TABLA 1. TUMORES PANCREÁTICOS. (Stoopen E. Miguel et.al 2000)

A. Tumores del páncreas exocrino.

1. Benignos.

- Cistoadenoma seroso
- Cistoademoma mucinoso
- Cistoadenoma mucinoso papilar intraductal
- Teratoma quístico maduro

2. Limítrofes (potencial de malignidad incierta)

- Tumor quístico mucinoso con moderada displasia
- Tumor intraductal mucinoso-papilar
- Tumor sólidoseudopapilar

3. Malignos

- Adenocarcinoma mucinoso ductal
 - Tumor de células gigantes parecido al osteoclastico
 - Cistoadenocarcinoma seroso
 - Cistoadenocarcinoma mucinoso
 - Cistoadenocarcinoma mucinoso papilar intraductal
 - carcinoma de células acinares y cistadenocarcinoma de células acinares
 - Pancreatoblastoma
 - carcinoma sólidoseudopapilar
-

TABLA 1. TUMORES PANCREÁTICOS. (Stoopen E. Miguel et.al 2000).

Continuación..

B. Tumores del páncreas endocrino

1. Benignos: adenoma bien diferenciado; insulinoma; adenoma no funcional.
2. limítrofes (potencial de malignidad incierta)
 - Tumor bien diferenciado no angioinvasivo
 - Insulinoma
 - Gastrinoma, VIPoma, glucagonoma, somastotatinoma, etc.
 - Tumor no funcional
3. Malignos
 - carcinoma bien o moderadamente diferenciado
 - Insulinoma
 - Gastrinoma, VIPoma, glucagonoma
 - carcinoma no funcional

carcinoma de célula pequeña o mal diferenciado, funcional o no funcional

C. Tumores no epiteliales.

1. Tumores mesenquimatosos: benignos; malignos
2. Linfomas

D. tumores secundarios o metastáticos

FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A INSULINA.

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) son mediadores importantes del crecimiento, desarrollo y sobrevivencia celular. Prácticamente cualquier tejido los sintetiza y su acción es modulada por un complejo grupo de moléculas como: proteínas de unión, proteasas y receptores. Los IGF's pueden promover el progreso del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis ya sea interactuando directamente con otros factores de crecimiento o bien indirectamente con otros sistemas moleculares, por ejemplo: hormonas esteroides o integrinas.

El sistema IGF esta compuesto por dos factores de crecimiento semejantes a insulina tipo 1 y 2 (IGF1 y IGF2), dos receptores de membrana (IGF-IR y IGF-IIR) y 6 factores asociados específicamente a proteínas (IGFBP-1 a IGFBP- 6). Durante la última década se han realizado investigaciones relacionadas con los IGFs, en ellas se ha logrado entender su funcionamiento no únicamente como mediadores endocrinos de la hormona del crecimiento induciendo actividades catabólicas y anabólicas sino también como polipéptidos que actúan de manera autocrina y paracrina regulando el crecimiento, apoptosis, diferenciación y transformación celular. En la tabla 2 se describe la localización, tamaño del gen y función principal de los factores de crecimiento semejantes a insulina que han sido objeto de estudio en diversos procesos neoplásicos y que serán estudiados en las muestras de tejido pancreático motivo del presente trabajo.

Tabla 2 . Localización y función de los factores de crecimiento semejantes a insulina (Pollak et,al.2004).

Factor de crecimiento semejante a insulina	Localización	Tamaño del gen (Kb)	Función
IGF 1	12q22	100	Organogénesis, regula la proliferación, diferenciación y transformación celular. Antiapoptótico
IGF 2	11q15	30	Fundamental durante el desarrollo fetal y embrionario.
IGFBP3	15q25	100	Unión y prolongación de la vida media de los IGF's en circulación.
IGF IR	7p12	8.9	Regula la respuesta a la unión con IGF1. Activación de un complejo sistema de señalización molecular intracelular

El IGF 1 tiene características de hormona circulante y de factor de crecimiento de tejido. La mayor parte del IGF1 circulante es producido por el hígado; sin embargo otros órganos también sintetizan este factor de crecimiento. El IGF 2 también es sintetizado por el hígado y otros tejidos, pero no es regulado por la hormona del crecimiento a diferencia de IGF 1 que es regulado por el eje: hormona liberadora de hormona del crecimiento-hormona del crecimiento-somastostatina.

IGF 1 e IGF 2 tienen 50% de homología en su secuencia de aminoácidos y su estructura es semejante a la insulina (Khandwala et,al.2000). La expresión del gen IGF1 se ve afectada por varias hormonas (vg. estrógenos, adrenocorticotropica, tirotropina, hormona luteinizante, hormona foliculoestimulante y gonadotropina coriónica).

El IGF 1 ejerce acción anabólica en el metabolismo de carbohidratos y proteínas incrementando la captura celular de aminoácidos y de la glucosa estimulando la síntesis de glucógeno y proteínas. Su actividad mitogénica la realiza incrementando la síntesis de DNA y estimulando la expresión de la ciclina D1, la cuál acelera la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Yu, Rohan.2000).

El receptor IGF I-R es una molécula señalizadora tirosin-cinasa de superficie celular que después de unirse a su ligando (IGF 1 o IGF 2) activa vías de señalización intracelular como MAPK (protein-cinasa mitogeno activada) y IP3 (fosfatidilinositol3'cinasa) , las cuales favorecen la proliferación celular.

La biodisponibilidad de los IGFs es regulada por la concentración específica de las proteínas de unión (IGFBP's), las cuales regulan el transporte de los IGFs a distintos compartimentos del organismo, modulan la interacción entre los IGFs y su receptor. Existe una competencia

entre el receptor y la proteína de unión por el ligando, de tal modo que si se tienen niveles bajos de los IGFBP's se incrementa la actividad mitogénica de los IGFs.

PROTEINA DE CHOQUE TERMICO HSP70

En relación a la proteína de choque térmico HSP70, ésta es una potente proteína de sobrevivencia cuya depleción provoca la muerte celular tumoral independiente de caspasas.

La muerte celular inducida por depleción de HSP70 es precedida por la liberación de enzimas lisosomales hacia el interior del citosol (Nylansted et,al.2004).

La familia de proteínas de choque térmico HSP70 consiste de moléculas chaperonas que se pueden expresar constitutivamente, pero también son inducibles por estrés. Se localizan en diferentes compartimentos intracelulares. El principal estrés inductor de la HSP70 es altamente expresado en el citosol y en la membrana plasmática de tumores primarios de varios orígenes. Su expresión en células normales es muy baja y restringida al citosol.

Los estudios que se han realizado incluyen la medición de los niveles séricos de los IGFs y su expresión en cáncer de mama, próstata, colon e hígado; en los cuáles se ha visto que el IGF 1 se encuentra sobre-expresado, el IGF2 aumenta su expresión y su concentración en plasma, el receptor IGF 1R en algunos canceres aumenta su expresión pero en el caso de cáncer de próstata y colon su expresión depende de la etapa de éstos. La proteína de unión IGFBP3 disminuye sus niveles plasmáticos en pacientes con cáncer y se ha observado una correlación con el riesgo a desarrollar cáncer en padecimientos que anteceden una neoplasia (Moschos, Mantzoros 2002).

Actualmente se desconocen los niveles de expresión de los genes: IGF1, IGF2, IGF 1R, IGFBP3 y HSP70 en adenocarcinoma pancreático; por lo que un estudio que contemple el análisis de los niveles de expresión ayudaría a hacer un pronóstico oportuno del riesgo de desarrollar cáncer o bien orientar hacia blancos moleculares para el tratamiento del cáncer.

3- JUSTIFICACIÓN

La expresión anormal de los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF 1, IGF2) y del factor de crecimiento semejante a insulina unido a proteína (IGFBP-3) son una herramienta importante no solo como marcadores tumorales, sino también, como ayuda para evaluar las funciones y por tanto el daño de tejidos específicos.

Se ha demostrado en diversos procesos neoplásicos la existencia de una expresión aumentada de, cuando menos dos de los genes que integran el sistema IGF's, así como su asociación con el riesgo de desarrollar procesos malignos.

Estudios recientes han mostrado que existe una expresión diferencial así como también niveles sanguíneos altos de los IGF's en diversas patologías como: cáncer de mama, colón, próstata, hígado y páncreas (Moschos ,et.al, 2002), sin embargo, no existe hasta la fecha, ningún estudio reportado que muestre la expresión de los factores de crecimiento de tipo insulínico 1 y 2, su receptor IGF 1R, proteína de unión IGFBP3 y de la proteína de choque térmico HSP70 en tejido pancreático con adenocarcinoma o pancreatitis .

En el presente trabajo determinamos la expresión diferencial de los IGFs y la proteína de choque térmico HSP70, producida por células sometidas a estrés.

4.-HIPÓTESIS.

La expresión diferencial de los genes de IGF 1, IGF 2, IGF IR, IGFBP3, que integran el sistema IGFs en biopsias de páncreas de pacientes con pancreatitis y con adenocarcinoma pancreático, puede determinar el riesgo y pronóstico de cáncer pancreático.

5.- OBJETIVO GENERAL.

Medir la expresión relativa de los genes: factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2), receptor de factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-IR), proteína de unión del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 3 (IGFBP-3) y proteína de choque térmico HSP70 en páncreas de pacientes con adenocarcinoma y pacientes con pancreatitis.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Estandarizar la metodología molecular para medir la expresión de los genes: IGF-1, IGF-2, IGF-IR, IGFBP-3 y HSP70 en páncreas de pacientes con adenocarcinoma y pancreatitis.

2.- Evaluar la expresión relativa de los genes: IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGFBP-3 y HSP70 en páncreas de pacientes con cáncer y pancreatitis; en función del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

6. MATERIALES y MÉTODOS.

6.1 PACIENTES.

Estudiamos 52 muestras de tejido pancreático obtenido de biopsias de 24 hombres y 28 mujeres con edad promedio de 51.7 ± 18 años (intervalo de 17 a 83 años). Los grupos de pacientes fueron:

- ❖ 9 biopsias de páncreas normales (GRUPO 1). Obtenidos de sujetos sanos con muerte cerebral.
- ❖ 8 biopsias de pacientes con pancreatitis crónica, 1 biopsia de paciente con pseudoquiste pancreático y 1 biopsia de paciente con quiste pancreático (GRUPO 2)
- ❖ 21 biopsias de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pancreático (GRUPO 3).
- ❖ 12 biopsias de pacientes con diagnóstico de cáncer maligno no pancreático; los cuales tuvieron el siguiente diagnóstico: 1 paciente con cáncer de duodeno, 1 paciente con tumor papilar quístico, 8 pacientes con cáncer de ampula de Vater, 1 paciente con cáncer de vías biliares intrahepáticas y 1 paciente con cáncer de vías biliares extrahepáticas (GRUPO 4).

Las biopsias que se analizaron se obtuvieron en el procedimiento quirúrgico después del diagnóstico preoperatorio obtenido por imagenología; los pacientes aun no recibían tratamiento.

6.2 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con el programa DNASTar a partir de las secuencias de RNAm de los genes reportados en el Gene Bank, NCBI. Las secuencias y sus características se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos.

Gen	Sentido	Antisentido	Producto (pb)
GAPDH	5'gaaggtgaaggtcggagt3'	5'gaagatggtgatgggatttc3'	255
IGF 1	5'ggggcaacaacaaaaggaaaat3'	5'tgggggacagtgcgagacc3'	512
IGF 2	5'cctgcccgcctctcgtgtctctc3'	5'ttgcgggcctgctgaagtagaag3'	564
IGF IR	5'ccacggccgcagacacctacaaca3'	5'acagcgacgggcagagcgatgat3'	562
IGFBP3	5'agcccgtccgtctccag3'	5'cttgcggcagcgtctact3'	440
HSP70	5'gtgccggcctacttcaacgactc3'	5'ctggcctgggtgctggacgaca3'	407

6.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.

La obtención de RNA total de la muestra de tejido pancreático se realizó por el método de tiocianato de guanidinio con el reactivo comercial Tripure (Boehringer Mannheim) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, a una cantidad de 50 a 100 mg de tejido congelado se le agregó 1 ml de reactivo Tripure, se colocó en el homogeneizador de tejido Polytron, se trituró rápidamente para evitar que se descongelara (se mantuvo en hielo) y se homogenizó con la punta de una micropipeta. Se incubó la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Tripure. Se homogenizó en vortex durante 15 segundos y nuevamente se incubó por 5 minutos a TA. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a TA. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un vial nuevo y se adicionaron 0.5 ml de isopropanol (químicamente puro) por cada ml de Tripure. Se homogenizó la mezcla por inversión y se incubó durante 10 minutos a TA.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12, 000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se secaron las muestras al vacío, hasta observar que se hubiera eliminado el etanol. Finalmente, se resuspendió el botón en 20-30 μ l de H₂O inyectable y se incubó entre 55 y 60 ° C durante 10 minutos. El RNA puro se almacenó a -70°C hasta su uso.

Una vez obtenido el RNA se determinó su pureza y concentración mediante espectrofotometría. Las muestras cuyo cociente A_{260}/A_{280} fue ≥ 1.8 se consideraron adecuadas para la síntesis de cDNA.

6.4 SINTESIS DE cDNA MEDIANTE REACCION DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR).

Se prepararon diluciones de aproximadamente 1 a 5 ng de RNA total puro. Se siguieron las recomendaciones del fabricante (SUPERSRIPT™ II .RNase HReverse Transcriptaset Invitrogen). De manera breve, en un volumen final de 20 μ l se llevó a cabo la reacción como se describe a continuación:

1.-En un tubo de 700 μ l para microcentrífuga se adicionaron: 1 μ l de oligo dT a una concentración de 500 μ g/ml, 1 ng a 5 μ g de RNA total, 2 μ l de dNTPs (mezcla de los cuatro nucleótidos a una concentración de 10 mM cada uno), H₂O-DEPC estéril o agua inyectable. Se mezcló, se calentó a 65 °C por 5 minutos y posteriormente, se pasó la mezcla rápidamente a hielo y se incubó 1 minuto. Se centrifugó a 12, 000 rpm durante unos segundos y se agregaron 2 μ l de amortiguador “First strand” 10X, 2 μ l de Ditiotreititol 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de RNAsa recombinante (RNaseOUT; 40 U/ μ l), se mezcló

cuidadosamente con la punta de una micropipeta y se incubó a 42 °C por dos minutos. Finalmente, se agregó 1 µl de SUPERSCRIPT II (InVitrogene). Se homogenizó la mezcla con la punta de una micropipeta y se incubó durante 50 minutos a 42 °C. Al término de la incubación se calentó la mezcla a 70 °C por 15 minutos para inactivar la enzima y se guardaron los productos de la reacción a -70 °C.

6.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El procedimiento para las PCRs se describe brevemente a continuación: Preparamos mezclas maestras con las cantidades de reactivos necesarias para el número de muestras a amplificar, el volumen final de la reacción fue de 25 µl. Las cantidades de cada uno de los reactivos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla maestra.

COMPONENTE	* 1 (µl)
H ₂ O inyectable estéril	15
Amortiguador para PCR 10x	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1.5
dNTP's	0.5
DMSO (dimetilsulfóxido)5%	1.25
Iniciador 5' (10 mM)	1.5
Iniciador 3' (10 mM)	1.5
cDNA	1.0
TaqPol	0.25

La amplificación de los genes GAPDH, IGF 1, IGF 2, IGF IR, IGFBP3 y HSP 70 de cada una de las muestras se realizó de manera simultánea utilizando una mezcla maestra que contenía todos los componentes descritos excepto los oligonucleótidos; los cuales fueron

agregados después de haber fraccionado la mezcla maestra en distintos tubos para las reacciones.

La tabla 5 muestra las condiciones de amplificación para cada gen.

Tabla 5. Condiciones de amplificación.

Gen	Pre-desnaturalización (un ciclo)	Desnaturalización	Alineamiento Tm	Síntesis	Extensión/ciclos
GAPDH	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	55°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos
IGF 1	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	53°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos
IGF 2	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	63°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos
IGF IR	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	61°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos
IGFBP3	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	57°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos
HSP70	94°C /2 minutos	94°C/1 minuto	63°C/1 minuto	74°C /1 minuto	74°C /10 minutos, 35 ciclos

Se establecieron 35 como número de ciclos en los se observa una banda bien definida de los amplicones de los 6 genes analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. Los productos obtenidos de las reacciones de amplificación por PCR, se visualizaron en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% en amortiguador de Tris-borato EDTA (TBE 1X). Los parámetros de corrimiento fueron: 80 V una hora. Se tiñeron los productos con bromuro de etidio 2 mg/ 100 ml de agarosa al 2%. En cada corrimiento electroforético se incluyó el marcador de peso molecular Φ X174 DNA/Hae III (Promega). Se visualizaron los corrimientos en un transiluminador de luz UV, se fotografiaron con una

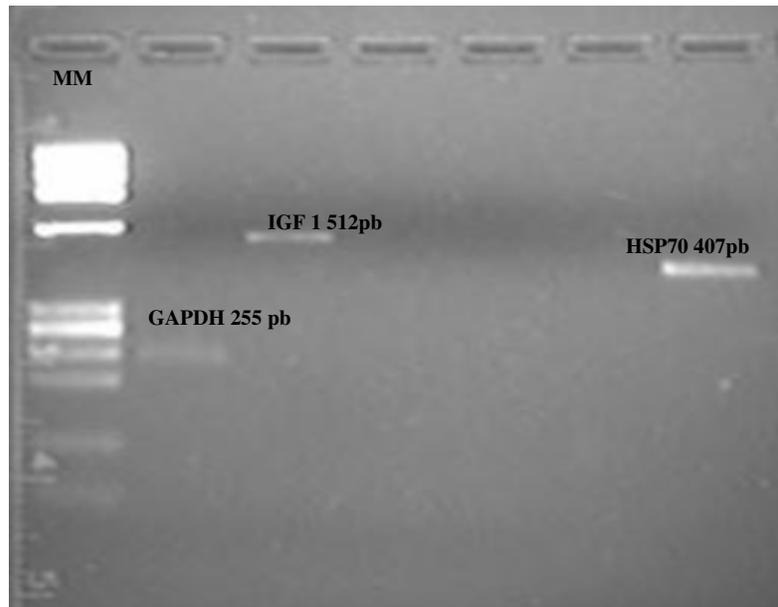
cámara digital (UVP) y se almacenaron las imágenes para su posterior análisis por densitometría con el programa LabWorks versión 4.6.

Análisis estadístico. Se utilizó el software SPSS versión 12 para Windows. Se realizaron dos análisis; el primero consistió en la comparación de los resultados de expresión relativa de los genes IGF1, IGF2, IGF IR, IGFBP3 y HSP70; en función del gen constitutivo GAPDH de los cuatro grupos de pacientes mediante la prueba de U de Mann-Whitney (grupo 1 vs grupo 2, 3 y 4). En el segundo análisis se comparó la frecuencia, y se expresó en % de expresión de cada grupo (grupo 1 vs grupo 2, 3 y 4) de los genes IGF 2, IGF IR e IGFBP3 con la prueba no paramétrica de χ^2 .

7. RESULTADOS

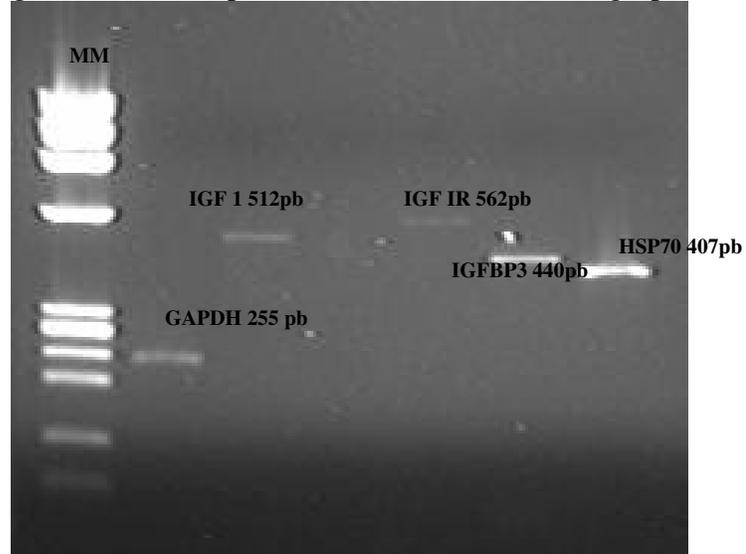
La figura 1 muestra la amplificación de los genes GAPDH (MM = 255 pb), IGF1 (MM = 512 pb) y HSP70 (MM = 407 pb); en el grupo 1.

Figura 1. Amplificados de los genes en una muestra del Grupo 1



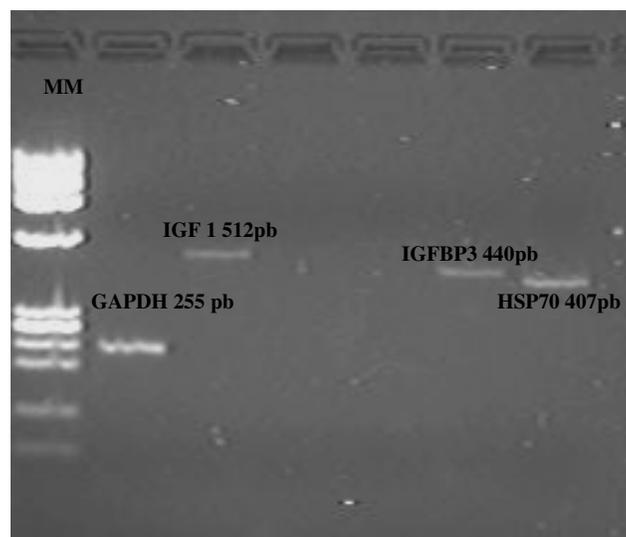
La figura 2 muestra la amplificación de los genes GAPDH (MM = 255 pb), IGF1 (MM = 512 pb), IGF IR (MM = 562 pb), IGFBP3 (MM = 440 pb) y HSP70 (MM = 407 pb); de tejido de páncreas de un paciente con adenocarcinoma pancreático.

Figura 2. Genes amplificados en una muestra del grupo 3.



La figura 3 muestra la amplificación de los genes GAPDH (MM = 255 pb), IGF1 (MM = 512 pb), IGFBP3 (MM = 440 pb) y HSP70 (MM = 407 pb); de tejido pancreático de un paciente con pancreatitis crónica.

Figura 3. Amplificación de los genes en una muestra del Grupo 2.



Se realizó el cálculo de la expresión relativa de cada gen amplificado mediante la relación de la intensidad de densidad óptica (IOD) del gen en estudio entre la intensidad de densidad óptica del gen constitutivo (IOD del gen en estudio/IOD de GAPDH). Las tablas 6,7, 8 y 9 muestran las relaciones obtenidas para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Tabla 6. Expresión relativa de los genes IGF1, IGFBP3 y HSP70. Grupo 1

Muestra de páncreas	Expresión relativa		
	IGF1	IGFBP3	HSP70
5	1.15	0	1.05
6	0.93	0	1.39
7	1.98	1.0	0.38
8	0.67	0	0.49
9	0.83	0	1.46
10	0.46	0.47	0.52
11	0.3	0	0.55
13	2.16	0	3.99
19	1.15	0	0.24

Tabla 7. Expresión relativa de los genes IGF1, IGF2 IGF IR, IGFBP3 y HSP70. Grupo 2

Muestra de páncreas	Expresión relativa				
	IGF1	IGF2	IGFIR	IGFBP3	HSP70
14	2.43	0	0	0.46	1.99
15	0.61	0	0	0	0.8
18	0.78	0	0	0	1.34
25	0.78	0	0	0	2.26
27	0.23	0.36	0	0	0.36
31	3.48	0	0	0	0.91
35	1.0	0.41	1.1	2.97	1.25
38	0.23	0	0	0.34	0.55
43	0.33	0.27	0	0.48	1.88
50	0.70	0	0	0.17	0.57

Tabla 8. Expresión relativa de los genes IGF1, IGF2 IGF IR, IGFBP3 y HSP70. Grupo 3

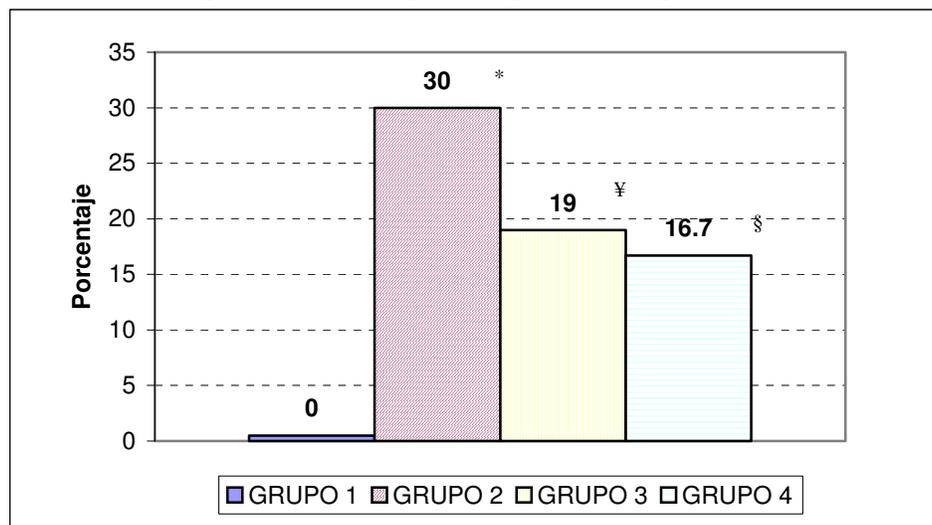
Muestra de páncreas	Expresión relativa				
	IGF1	IGF2	IGF1R	IGFBP3	HSP70
1	0.71	0	0	0	0.45
2	0.86	1.19	0	0.46	1.19
3	0.02	0	0	0	0.07
4	0.46	0	0	0	0.84
12	0.33	0	0	0.17	0.56
16	0.93	0	0	0	1.39
17	0.32	0	0	0	1.51
20	2.76	0	0	0	0.68
22	1.11	0	0	1.19	0.55
23	1.61	0	0	0	0.77
24	0.45	0	0	0.29	0.58
26	4.1	0	0	0	2.73
28	1.63	0	0	0	1.58
33	0.68	0.12	0.43	0.53	0.51
36	0.34	0	0	0.62	0.83
41	0.47	0.83	0	1.41	0.77
42	0.38	0	0	0.21	0.2
47	0.31	0	0.54	0.4	0.67
48	0.63	0.37	0	0.85	0.39
49	0.54	0	0	0	0.9
54	0.48	0	0	0.3	0.23

Tabla 9. Expresión relativa de los genes IGF1, IGF2 IGF IR, IGFBP3 y HSP70. Grupo 4

Muestra de páncreas	Expresión relativa				
	IGF1	IGF2	IGF IR	IGFBP3	HSP70
21	1.97	0	0	0	2.9
29	0.42	0	0	0	0.49
30	0.52	0	0	0	0.54
32	0.13	0	0	0.73	0.87
37	0.25	0	0	0.21	0.4
40	1.11	0	0	1.19	0.55
44	0.48	0.11	0	0.76	0.7
45	0.44	0	0	2.54	0.59
46	0.60	0	0	2.39	1.45
51	0.37	0.2	0	0	0.73
52	0.77	0	0.11	0.4	1.05
55	0.23	0	0.16	0.56	0.22

La figura 4 muestra la frecuencia de expresión por grupo de pacientes del gen IGF2. En el grupo 1 (grupo control normal) ninguna de las 9 muestras amplificó para este gen. En el grupo 2 (pancreatitis crónica y quistes), el gen IGF2 amplificó en mayor proporción (30 %) que en los grupos 3 (19%) y grupo 4 (16.7%); sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.246$, $p = 0.412$ y $p = 0.592$, grupo 1 vs grupos 2,3 y 4 respectivamente).

Figura 4. Porcentaje de expresión del gen IGF2



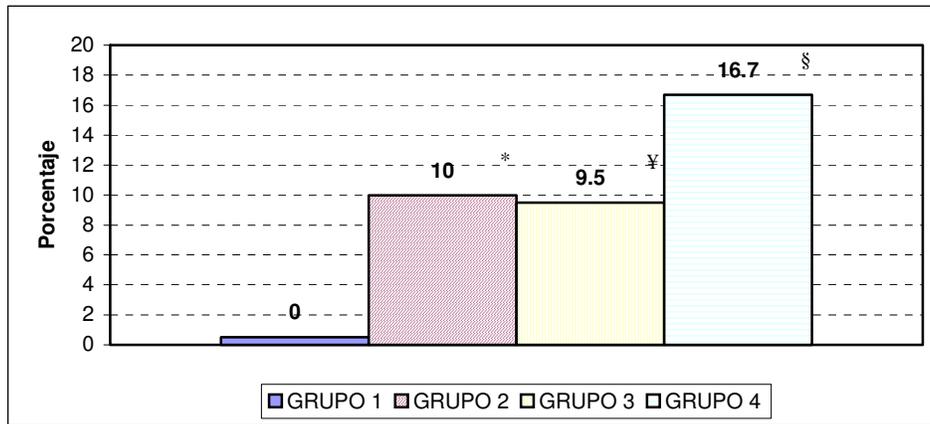
* $p=0.246$

¥ $p=0.412$

§ $p=0.592$

La figura 5 muestra la frecuencia de expresión por grupo de pacientes del gen IGF IR .En el grupo 1 ninguna de las 9 muestras amplificó para éste gen, no obstante que el gen constitutivo amplificó en las 9. La proporción entre los grupos no mostró diferencias significativas ($p = 1.0$; $p = 0.873$ y $p = 0.592$; grupo 1 vs grupos 2, 3 y 4 respectivamente) sin embargo se observa que en el grupo 4 (cáncer no pancreático) la proporción es mayor (16.7 %).

Figura 5. Porcentaje de expresión del gen IGF IR.



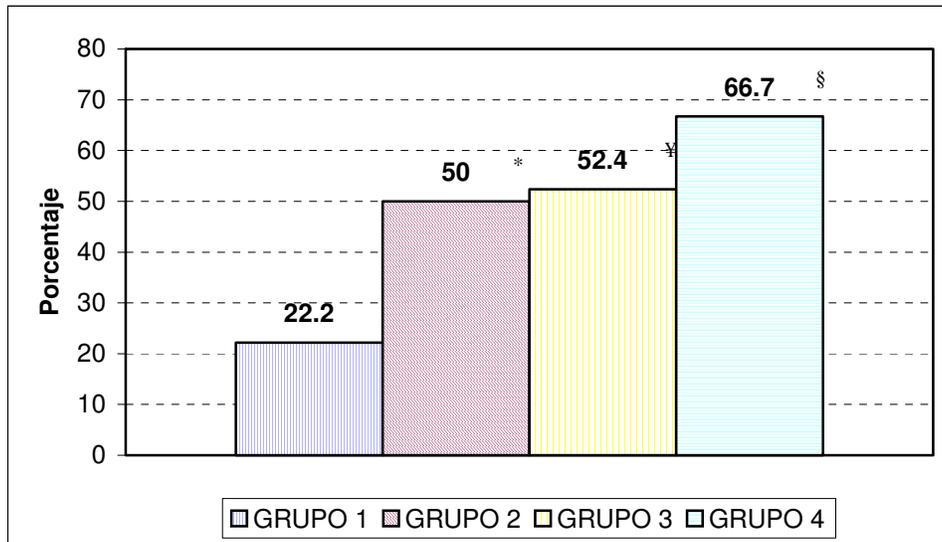
* $p=1.0$

¥ $p=0.873$

§ $p=0.592$

La figura 6 muestra la frecuencia de expresión por grupo de pacientes del gen IGFBP3; aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p = 0.437$; $p = 0.260$ y $p = 0.115$; grupo 1 vs grupos 2, 3 y 4 respectivamente), se puede ver que la proporción del gen IGFBP3 expresada es mayor en el grupo 4 (cáncer no pancreático) que en los otros grupos y se ve una tendencia ($p = 0.115$).

Figura 6. Porcentaje de expresión del gen IGFBP3.



* $p = 0.437$

¥ $p = 0.260$

§ $p = 0.115$

8. DISCUSIÓN.

Los resultados del análisis estadístico mostraron que no existe diferencia en la expresión relativa de los genes expresados en los 4 grupos. Sin embargo, se observó una tendencia en la expresión relativa del gen IGF1, el cual se expresó más en el grupo 1 (control normal) comparado con el grupo 4 (cáncer maligno; 0.93 vs 0.48; $p=0.053$), y la expresión relativa del gen IGFBP3 fue menor en el grupo 1 que en el grupo 4 (0.0 vs 0.48; $p = 0.061$). Lo anterior sugiere que la proteína de unión IGFBP3 desempeña una función reguladora en los procesos malignos al aumentar su expresión para modular la biodisponibilidad de los factores de crecimiento semejantes a insulina (Firth and Baxter 2002) mediante la inhibición o incremento de las acciones de los IGFs. El modelo más simple descrito, postula que las IGFBPs compiten con el receptor por los ligandos, lo que resulta en la supresión o estimulación de la proliferación celular (Pollak, 2000; Pollak 2001).

El análisis de las frecuencias de expresión de los genes IGF2, IGFIR e IGFBP3 entre los distintos grupos no mostró diferencias entre los cuatro grupos.

Los genes IGF2 e IGF IR no se expresaron en los páncreas de sujetos sanos. La expresión de éstos genes se ha descrito en distintos procesos neoplásicos (O Larsson et. al 2005; Le Roith et. al 2003.). IGF2 e IGF IR intervienen de manera importante en el desarrollo, diferenciación y proliferación celular. La expresión de éstos genes en los pacientes con pancreatitis, es una prueba de que en el páncreas está ocurriendo una importante diferenciación y proliferación celular, con lo que se puede predecir el desarrollo de un proceso neoplásico. Un estudio realizado en pacientes con cáncer gástrico muestra mayor expresión del gen IGF2 en comparación con el tejido normal adyacente al tumor, lo cual

sugiere la conversión de células epiteliales neoplásicas en distintos tipos de cáncer que involucran su transformación y proliferación (H.K Yi et,al. 2003) .

En relación a la proteína de choque térmico HSP70, al ser inducida por estrés esperábamos encontrarla aumentada en los grupos 2, 3 y 4, como en otros procesos malignos en los que se ha observado una sobre-expresión del gen (Garrido et. al 2003) y en el grupo 1 esperábamos encontrarla menos expresada, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa del gen HSP70 en éstos grupos. Posiblemente la expresión de HSP70 no interviene directamente en la proliferación y diferenciación celular en el cáncer pancreático y los factores de crecimiento son los que principalmente modulan la carcinogénesis; como el receptor IGF IR el cual ha sido ampliamente estudiado en distintos procesos malignos como: cáncer de mama (Sarakbi , et. al 2006), colon (Wu Y, et. al 2002) y próstata (Hellawell et. al 2002), en donde los autores han reportado su sobre-expresión con nula expresión en tejido sano.

Un estudio con mayor número de pacientes permitirá establecer si la detección de la expresión de los genes IGF I e IGFBP3 ayuda al diagnostico temprano del cáncer de páncreas, hecho que actualmente no es posible hasta que el tumor alcanza una etapa avanzada.

9. CONCLUSIONES

- El presente trabajo muestra una expresión diferencial de los genes IGF2, IGF IR, entre los sujetos sin alteraciones pancreáticas grupo 1(control normal) y los pacientes de los grupos 2 (pancreatitis y quistes), 3(adenocarcinoma pancreático) y 4 (carcinoma maligno no pancreático). Si bien las diferencias no fueron significativas, se observó una tendencia , lo cual muestra evidencia de que estos genes modulan la proliferación y diferenciación celular al igual que en otros estudios previamente descritos en donde se estudiaron tejidos diferentes (cáncer de próstata, hígado, pulmón, colon y seno).
- La expresión del gen IGFIR en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de páncreas y vías biliares ubica a ésta proteína como un posible blanco molecular en el tratamiento y diagnóstico de cáncer.
- Debido a que no se observó diferencia en la expresión relativa de los genes IGF1, IGF2, IGF IR, IGFBP3 y HSP70 (probablemente por el tamaño de la muestra), se sugiere aumentar el número de controles normales para determinar si se observan diferencias en la expresión de los genes que integran el sistema IGFs, en los padecimientos pancreáticos.
- Dada la complejidad de los procesos cancerosos; es de gran importancia considerar para un estudio posterior el devenir del proceso neoplásico, lo cual proporcionará información útil para el pronóstico de la enfermedad, al determinar si la expresión de los genes del sistema IGF es distinta en cada etapa.

-
- La proteína de choque térmico se expresó de manera constitutiva en el tejido pancreático y no se observó un aumento de su expresión en relación a la expresión del gen constitutivo GAPDH.
 - Se sugiere para un estudio posterior considerar aspectos nutricionales, edad y sexo de los pacientes debido a que el sistema integrado por los IGFs se ve afectado por éstas variables.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. 2003. The IGF 1 receptor in cancer biology. *International Journal of Cancer*. **107**:873-877.
- 2.- Beere H, Wolf B, Cain K, Mossert D, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto R, Cohen G, Green D. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*. **2**: 469-475.
- 3.- Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. 2003. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **37** (1): 198- 207.
- 4.-Daugaard M, Jäätelä M, Rohde M. 2005. HSP70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle*. **4** (7): 877-880.
- 5.- Donghui L. 2004. Epidemiology and molecular epidemiology of pancreatic cancer. En: Abbruzzese James L, Evans Douglas B, Willet G. Christopher, Fenoglio-Preiser Cecilia. *Gastrointestinal Oncology*. Nueva York. Estados Unidos de America. Oxford University Press, pp.: 329-343.
- 6.-Dong Z, Yao D, Yao D.B, Wu X, Wu W , Qiu L, Jiang D, Zhu J, Meng X. 2005. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World Journal Gastroenterology*. **11**(30): 4655-4660.
- 7.-Garrido C, Schmitt E, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. 2003. HSP 27 and HSP70 potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*. **2** (6) : 579-584.
- 8.-Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. 2006. Heat shock proteins 27 and 70 antiapoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**(2):2592-2601.
- 9.-Grimberg A, Cohen P. 2000. Role of insuline growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. **183**:1-9.
- 10.-Guyton, A. Hall, J. 2001. *Tratado de fisiología médica*. México. McGraw-Hill Interamericana. pp 1063.
- 11.-Hanahan D, Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**:57-70.

-
- 12.- Kaplan L, Pesce A, Kazmierczak S. 2003. Clinical chemistry, theory, analysis, correlation. Estados Unidos de América. Mosby. pp 535
- 13.-Khandwala H, McCutcheon I, Flyvberg A, Friend K.2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine Reviews* **21**(3):215-244.
- 14.-Larsson O, Girnita A, Girnita L. 2005. Role of insulin growth factor-I receptor signalling in cancer. *British Journal of Cancer* **92**: 2097-2101.
- 15.-Luo S, Tan W, Deng W, Zhuang S, Luo J .2005. Expression of albumin, IGF-1, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrosis. *World Journal Gastroenterology*. **11**(27): 4272-4276.
- 16.-Nylandsted J, Gyrd M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer M, Weber E, Multhoff E, Rohde M, Jäättelä M. 2004. Heat Shock Protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine*. **200**(4):425-435.
- 17.-Moschos S, Mantzoros C.2002. The role of the IGF system in cancer from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* **63**:317-332.
- 18.-Mosser D, Caron A, Bourget L, Meriin A, Sherman M, Morimoto R, Massie B. 2000. The chaperone function of hsp 70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. **20** (19): 7146-7159.
- 19.-Pandita T, Higashikubo R, Hunt C. 2004. HSP70 and genomic stability. *Cell Cycle*. **3** (5): 591-592.
- 20.-Peto J.2001.Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*.**411**: 390-395.
- 21.-Pollak M. 2000. Insulin like growth factor physiology and canecr risk. *European Journal of Cancer*. **36**: 1224-1228.
- 22.-Pollak M, Schernhammer E, Hankinson S.2004. Insulin growth factors and neoplasia. *Nature Reviews*.**4**:505-518.
- 23.-Ponder B.2001.Cancer genetics. *Nature*. **411**: 336-341.
- 24.-Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S, Maise C, Daugas E, Zamzani N, Mak T, Jäättelä M, Penninger J, Garrido C, Kroemer G.2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biology*.**3** : 839-843.

25.-Rohde M, Daugaard M, Hartvig J, Mitte H, Nylandsted J, Jäätelä M. 2005. Members of the heat shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanism. *Genes & Development*. **19**: 570-582.

26.-Schedlich L, Graham L. 2002. Role of insulin like growth factor binding protein-3 in breast cancer cell growth. *Microscope Research and Techniques*. **59**: 12-22.

27.-Sharf J, Dombrowski F, Ramadori F.2001. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Journal of Clinical Molecular Pathology*. **54**:138-144.

28.-Sherr, J.Charles. 2001.Principles of tumor suppression. *Cell*. **116**:235-246.

29.- Stoopen M, Dominguez E, Barois V. 2000. Diagnóstico Radiológico de los tumores del páncreas exocrino. En: Herrera M, Uscanga L, Robles G, Campuzano M. Páncreas. México. McGraw Hill- Interamericana . pp 323

30.-Valentinis B, Baserga R. 2001 .IGF I receptor signalling in transformation and differentiation. *Journal of Clinical Molecular Pathology*. **54**:133-137

31.-Vella V, Sciacca L, Pandini G, Mineo R, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A.2001. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Journal of Clinical Molecular Pathology*. **54**:121-125

32.-Yee D. 2006. Targeting insulin like growth factor pathways. *British Journal of Cancer*. **94**: 465-468.

33.-Yi H.K, Hwang P.H, Yang D.H, Kang C.W, Lee D.Y.2001. Expression of the insulin like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *European Journal of cancer*.**37**: 2257- 2263.

33.-Yu H, Rohan T.2000. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute*. **92**(18):1472-1489.

34.<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>