



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-1 EN TUMORES
MAMARIOS DE MUJERES MEXICANAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. SÓCRATES AVILÉS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

COMITÉ TUTOR: DR. DIEGO JULO ARENAS ARANDA
DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

TLALNEPANTLA, EDO DE MÉXICO.

FEBRERO 2010



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.

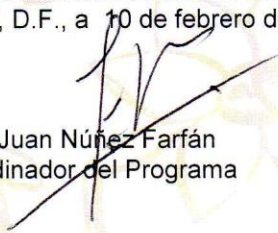
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de noviembre del 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **AVILÉS VÁZQUEZ SÓCRATES** con número de cuenta **98339921** con la tesis titulada **"EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-1 EN TUMORES MAMARIOS DE MUJERES MEXICANAS"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
Vocal: DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de febrero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme continuar con mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca de posgrado para poder realizar este trabajo. No. de beca 202849

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por otorgarme una Beca Tesis de Posgrado.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por la disponibilidad que tuvo para dirigir este trabajo y por sus comentarios y sugerencias orientados siempre a la mejora del trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial Dr. Rogelio Hernández Pando y Dr. Diego Julio Arenas Aranda por las sugerencias y la ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por compartir sus conocimientos y guiarme de la mejor manera durante estos años que he estado en su laboratorio, por sus consejos tanto académicos como para mi vida personal, por su tolerancia y amistad, gracias profe.

A la M. en C. Guadalupe Martínez Hernández por sus consejos y amistad, por la puerta que me abrió en la docencia.

Al Dr. Normand García Hernández por su ayuda tanto en el laboratorio como fuera de él pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por las facilidades para realizar los cultivos celulares.

A los Doctores Marco Antonio Cerbón Cervantes y Jorge Melendez Zajgla por la revisión y sugerencias.

Al Dr. Arturo Méndez Escudero por la ayuda recibida en la obtención de los controles del experimento.

Al M. en C. David Esaú Frago Fonseca por su valiosa ayuda en la recolección de muestras pero sobre todo por la amistad durante este tiempo.

Al Dr. Alejandro Córdova por su colaboración en la parte experimental del trabajo.

A la Dra. Eunice López por la ayuda en la parte estadística de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biología del Desarrollo Alejandro y Jaime por hacer más agradable la estancia.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Humana por todos los momentos que pasamos dentro y fuera de el: Rubén "Gallo", Susana, Rubén "kid", Abraham, Luz, Araceli, Nacho, Ulises, Mario, Felipe, Israel, Erick, Dra. Gaby, Carmen.

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos fallecidos.

A mis padres por darme la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado, por su ayuda tanto material como espiritual durante todo este tiempo, por su tolerancia, por sus cuidados y preocupaciones, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí, no tengo palabras para agradecerles.

A mis hermanos Chantal y Dante por su gran apoyo, por sus críticas y la motivación para seguir adelante, por todos los momentos que hemos pasado.

A Gyovana por ser la maravillosa persona que es, por su apoyo incondicional, por sus cuidados, por su gran tolerancia, pero sobre todo por su gran amor, porque a pesar de la distancia seguimos aquí, eres lo mejor que me ha pasado.

A mi abuela Enriqueta por sus cuidados y por estar siempre pendiente de lo que me pasa.

A mi familia en especial a mis tíos: Isidro, Elia, Paula, Yolanda, Bertha y Juan por el interés sobre lo que hago y por el apoyo recibido durante este tiempo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
LA GLÁNDULA MAMARIA.....	11
CÁNCER.....	13
CÁNCER DE MAMA	15
ETAPAS DEL CÁNCER DE MAMA	19
FACTORES DE CRECIMIENTO Y CÁNCER	20
RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO Y CÁNCER.....	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
MUESTRAS	29
CULTIVO CELULAR	29
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA	29
TRANSCRIPCIÓN REVERSA	30
RT-PCR EN TIEMPO REAL Y TIEMPO FINAL	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31

RESULTADOS	32
MUESTRAS DE TUMORES MAMARIOS.....	32
EXTRACCIÓN DE RNA.....	34
EXPRESIÓN DE FGFR-1 EN CULTIVOS CELULARES.....	36
RT-PCR TIEMPO FINAL PARA FGFR-1 Y HPRT.....	39
RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	45
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

ABREVIATURAS

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BRCA: Breast cancer associated gene.

CASP2: Caspasa 2

CASP6: Caspasa 6

cDNA: Acido Desoxiribonucleico complementario.

Ct: Ciclo umbral.

CYC: Citocromo C

DNA: Acido Desoxiribonucleico

E2: Estradiol

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

FGFR: Receptor del factor de crecimiento fibroblástico.

HER-2/NEU: Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2

HPRT: Hipoxantina fosforibosil transferasa.

IGF-I: Factor de crecimiento similar a la insulina 1

IGF-II: Factor de crecimiento similar a la insulina 2

Mcl-1: Proteína de la diferenciación de células de leucemia mieloide.

mM: Mili molar

NF κ B: Factor nuclear kapa b

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PM: Peso molecular

RE: Receptor de estrógenos

RP: Receptor de progesterona

RNA: Acido ribonucleico.

RT-PCR: Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa

STAT-3: Transductor de señal activador de la transcripción 3

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.
TN: Triple negativo.
TNF: Factor de necrosis tumoral
VEGF: Factor de crecimiento vasculo endotelial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad por cáncer de mama en México de 1993 a 2002.. ... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. Estructura de la glándula mamaria..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 3. Estructura de un receptor del factor de crecimiento fibroblástico. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 4. Esquema del Splicing alternativo.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 5. Productos de extracción de RNA total de tejido mamario tumoral..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 6. Productos de la extracción de RNA total por el método de trizol de muestras de tejido tumoral mamario.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 7. Productos de extracción de RNA total de tejido mamario sano.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 8. Productos de extracción de RNA total de células MCF-7 y MDA-MB-23.... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 9. Imagen representativa del cultivo de la línea celular MCF-7 a los 7 días de cultivo. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 10. Imagen representativa del cultivo de la línea celular MDA-MB-231 a los 7 días de cultivo. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 11. Secuencia del gen FGFR-1..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12. Secuencia del gen HPRT..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Productos de PCR del gen FGFR1 y 3 con cDNA de células MCF-7 y MDA-MB-231.. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 14. Productos de PCR del gen FGFR-1 utilizando cDNA de tumores y tejido sano. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 15. Productos de PCR del gen FGFR-1 utilizando cDNA de tumores y tejido sano. .
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Productos de PCR del gen HPRT utilizando cDNA de tumores y tejido sano..
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de las línea celular
 MCF-7 gradiente de magnesio..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de las líneas celulares
 MCF-7 y MDA-MB-231. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Curva de fusión para identificar que los oligonucleótidos para FGFR-1 no
 forman estructuras secundarias. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de los tejidos
 tumorales M3, M5, M7, M9, M11, M16, M17 y sanos S2, S3 y S4. **¡Error! Marcador no
 definido.**

Figura 21. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen FGFR-1..
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 22. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de los tejidos
 tumorales M18, M19, M81, M83, M84, M87, M88 y M89, y los tejidos sanos S5 y S6..
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 23. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen FGFR-1..
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 24. Curva de amplificación del gen HPRT utilizando cDNA de los tejidos tumorales
 y tejidos sanos..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 25. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen HPRT..
 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 26. Amplificación de FGFR-1 en tumores mamarios. Análisis comparativo de Delta
 Ct..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 27. Amplificación de FGFR-1 en tumores mamarios. Análisis por el método Delta
Delta Ct..... **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los tejidos tumorales analizados. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. Edades de las donadoras de los tejidos sanos utilizados. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. Distribución de tumores por etapa..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 4. Clasificación de tumores por etapa y edad..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 5. Relación de absorbancias 260/280 de los extractos de RNA de las muestras de
mama.. **¡Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema mundial de salud que cada año ocasiona más de 400 000 defunciones en el mundo. En México, a partir del 2006 ha llegado a ser la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años, y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres. Los factores de crecimiento se definen como polipéptidos que modulan la proliferación celular a través de la unión con receptores específicos de alta afinidad localizados en la membrana celular, desencadenando una cascada de señales bioquímicas que resultan en la activación o represión de distintos genes.

Los factores de crecimiento fibroblástico son una familia de ligandos que señalizan por medio de receptores tirosina cinasa, a través de la activación de sus receptores (FGFR) se estimula la mitogénesis, diferenciación, proliferación, migración, y angiogénesis y su inadecuada expresión ha sido implicada en la carcinogenesis y el cáncer de mama.

El epitelio mamario, cuyo crecimiento es regulado por hormonas esteroides endógenas puede dar lugar a tumores que como en el tejido parental, su crecimiento es también dependientes de hormonas esteroides. Sin embargo, el crecimiento de estos tumores puede volverse independiente de las hormonas esteroides, limitando la eficacia de las terapias anti-hormonales para su tratamiento, esto ocurre principalmente en cáncer de mama y de próstata. Una hipótesis para explicar la progresión a la independencia de esteroides es que el tumor adquiere la capacidad constitutiva de expresar factores de crecimiento autocrinos inducidos previamente por las hormonas esteroides. Entre los cuales los factores de crecimiento fibroblástico son candidatos potenciales vía sus receptores, de los cuales el FGFR-1 ha sido implicado en el proceso de carcinogénesis.

Hay fuertes evidencias de la implicación de los FGFs y sus receptores en cáncer mamario murino y en líneas celulares de cáncer de mama, sin embargo para la enfermedad en humanos, la evidencia es menor y muchas veces el entendimiento de la misma se basa en analogías con los modelos murinos.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de expresión del receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1 en tumores mamarios de mujeres mexicanas, así como su posible relación con la etapa del tumor por RT PCR y RT PCR en tiempo real.

Se utilizaron 15 tumores esporádicos, vírgenes a tratamiento en estadios II y III de cáncer de mama y como control 5 tejidos mamarios normales. Se cultivaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 para utilizarse como referencia. Dentro de los resultados obtenidos se tuvo que la línea celular MDA-MB-231 registró una mayor expresión de FGFR-1. En los tumores se observó una mayor expresión de FGFR-1 con respecto a los tejidos normales, la cual no tiene relación con la etapa del tumor, y además fue estadísticamente significativo $P < 0.05$. Por lo que se sugiere a FGFR-1 como un posible candidato para marcador de pronóstico, diagnóstico y posible blanco terapéutico.

ABSTRACT

Breast cancer is a worldwide health problem that each year causes more than 400 000 deaths in the world. In Mexico, starting in 2006 has become the second leading cause of death among women ages 30 to 54 years and ranks as the leading cause of malignant tumors in women. Growth factors are defined as polypeptides that modulate cell proliferation through binding to specific high affinity receptors located on the cell membrane, triggering a cascade of biochemical signals that result in activation or repression of different genes. Fibroblast growth factors are a family of ligands that signal through tyrosine kinase receptors, through activation of its receptor (FGFR) stimulates mitogenesis, differentiation, proliferation, migration, and angiogenesis and its inappropriate expression has been implicated in carcinogenesis and breast cancer.

The mammary epithelium, whose growth is regulated by endogenous steroid hormones, can lead to tumors like the parental tissue, that their growth is also dependent on steroid hormones. However, the growth of these tumors can become independent of steroid hormones, limiting the effectiveness of anti-hormonal therapies for treatment, this occurs mainly in breast cancer and prostate cancer. One hypothesis to explain the progression to steroid independence is that the tumor acquires the ability to express constitutive autocrine growth factors previously induced by steroid hormones. Including the fibroblast growth factors are potential candidates via their receptors, of which the FGFR-1 has been implicated in the carcinogenesis process.

There is strong evidence of the involvement of FGFs and their receptors in murine mammary cancer, cell lines and breast cancer, however for the disease in humans, the evidence is less and often the understanding of it is based on analogies with mouse models. For these reasons the aim of this study was to evaluate the degree of receptor expression of fibroblast growth factor 1 in mammary tumors from Mexican women and its possible relationship with tumor stage by RT PCR and real-time RT PCR.

15 sporadic tumors virgins to treatment in stage II and III of breast cancer were used, and 5 normal breast tissue as control MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were cultured for use as a reference. Among the results obtained was that the cell line MDA-MB-231 showed increased expression of FGFR-1 than MCF-7. In tumors was observed an increased expression of FGFR-1 with respect to normal tissues, which is not related to tumor stage and also was statistically significant $P < 0.05$. It is suggested FGFR-1 as a potential candidate for a marker of prognosis, diagnosis and possible therapeutic target.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema mundial de salud que cada año ocasiona más de 400 000 defunciones en el mundo. En México, a partir del 2006 ha llegado a ser la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años, y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres, su incidencia y relación con la mortalidad aumentan conforme a la edad después de los 35 años. Según datos del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI)¹, en 1990 ocurrieron 2 230 decesos atribuibles al cáncer de mama, lo que representó el 1.67% del total de defunciones ocurridas en mujeres de 25 años o más. En 1994 dicha cifra fue de 2 785 (1.90%) muertes y para 1998 aumentó a 3 380 (2.10%) fallecimientos. En 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas, lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas (figura 1).

La tasa de mortalidad por cáncer mamario en México ha registrado un aumento importante de 1950 a 2005, pasando de una tasa de 2 por 100,000 mujeres a 9 por 100,000 mujeres y aumentando 2.5 veces de 1992 a 2009, por el contrario la mortalidad por cáncer cérvico uterino ha ido descendiendo a partir de 1990, de tal forma que desde el 2005 la tasa de mortalidad de cáncer de mama es superior a la de cáncer cérvico uterino². En el 2006 las mujeres mexicanas de entre 30 y 65 años presentaron un riesgo mayor de morir por cáncer mamario que por cáncer cérvico uterino, mientras que en 1980 el riesgo de morir por cáncer cérvico uterino era dos veces mayor que por cáncer mamario. En América Latina y el Caribe, aproximadamente 35 mil mujeres fallecen de cáncer de mama al año.²

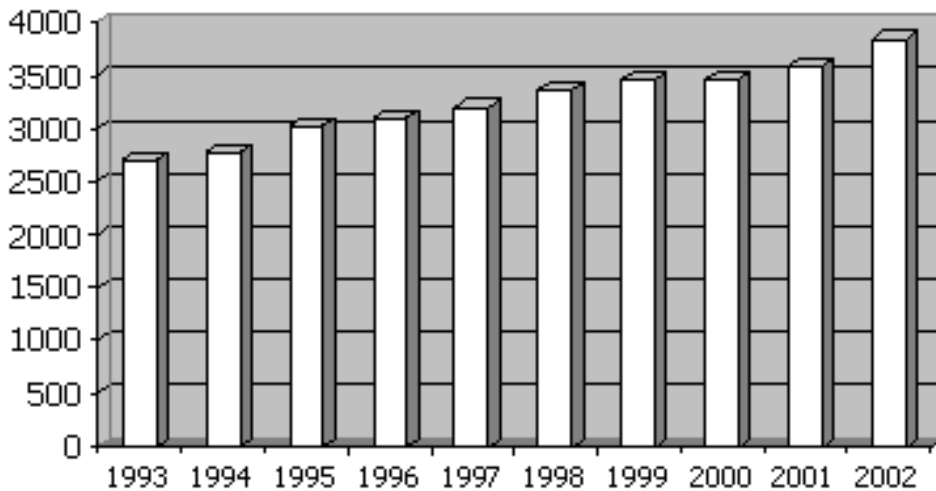


Figura 1. Mortalidad por cáncer de mama en México de 1993 a 2002. Se presenta el número total de muertes asociadas con esta enfermedad, fuente: INEGI, 2004¹.

LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria está formada por células epiteliales de origen ectodérmico (parénquima) y por un componente de tejido conectivo de origen mesodérmico denominado estroma que lleva vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

Presenta una morfología variable a lo largo del desarrollo o condición reproductiva, en el nacimiento ya se ha establecido un sistema rudimentario de conductos en el que pueden reconocerse células epiteliales y mioepiteliales. En la pubertad, en respuesta a los niveles crecientes de hormonas ováricas sexuales, se desarrolla el sistema de conductos epiteliales, se acumula grasa en el tejido conectivo entre los lóbulos y los lobulillos, aunque las unidades secretoras verdaderas no se formarán hasta la gestación. Durante la lactancia, los cambios morfológicos son mínimos. Después de la menopausia las estructuras epiteliales y del tejido conectivo experimentan atrofia provocada por la deficiencia hormonal. Anatómicamente, el tejido glandular de la mama sexualmente madura (en reposo), está constituido por 15 a 20 lóbulos dispuestos radialmente en dirección al pezón.³

Cada lóbulo tiene su propio conducto excretor que siguen un trayecto vertical a través de la mama y está separado de los otros por capas de tejido conectivo

fibroso y grasa. Los lóbulos están formados por múltiples lobulillos conectados por tejido conectivo, vasos sanguíneos y conductos, y a su vez los lobulillos están constituidos por conjuntos de alvéolos o acinos que se abren a múltiples conductillos galactóforos. Estos pequeños conductos se unen para formar conductos mayores y, finalmente, se forma un conducto simple para cada lóbulo o conducto galactóforo principal que tienen su propia salida en el pezón.³

Los lóbulos y los conductos están rodeados por 2 capas celulares: una interior de células epiteliales secretoras y una exterior de células mioepiteliales, las células epiteliales tienen una forma columnar o cuboidal y su cantidad de citoplasma depende de la influencia hormonal. La configuración cuboidal y el citoplasma decrecido, caracteriza a la falta de influencia hormonal. Las células mioepiteliales se localizan entre las células epiteliales, tienen un núcleo más pequeño y un citoplasma eosinófilo fibrilar debido a la presencia de fibrillas contráctiles similares a las del músculo liso, las que proveen contractibilidad al tocar el ducto y lleva la secreción hacia el pezón. Las lesiones cancerosas mamarias se localizan bien en los elementos glandulares, en los ductales o en el soporte adiposo o fibroso.³

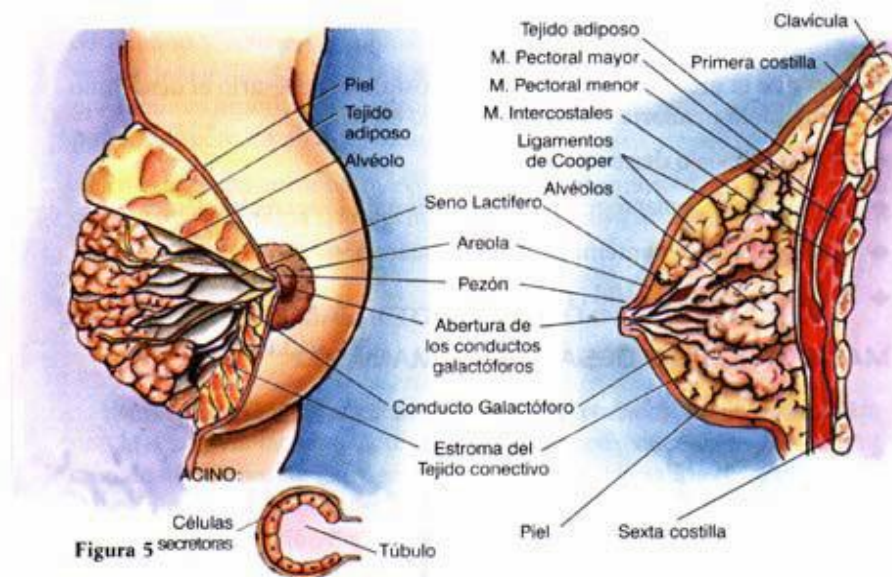


Figura 2. Estructura de la glándula mamaria.

CÁNCER

La multiplicación de las células está cuidadosamente regulada y responde a las necesidades específicas del organismo. En un animal joven, la multiplicación excede a la muerte celular, por lo que el organismo crece; en un adulto, los procesos de nacimiento y muerte de las células se equilibran para alcanzar un estado estable. En algunos tipos celulares del adulto la renovación es rápida: las células del intestino tienen una vida media de escasos días antes de morir y ser reemplazadas; algunos leucocitos sanguíneos se reemplaza-con igual rapidez. En contraste, los eritrocitos humanos tienen una vida media de unos 100 días, las células hepáticas sanas mueren rara vez y, en adultos, hay una lenta pérdida de células encefálicas, con reemplazo muy escaso o nulo.⁴

Los estrictos controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre comienza a crecer y a dividirse en forma descontrolada, al margen de que su proliferación sea requerida por el organismo y las células hijas son propensas a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida. Este clon de células forma una masa, denominada tumor. Algunos tumores no tienen consecuencias graves para la salud, pero los que se diseminan por todo el organismo por lo general producen síntomas de diferente grado de gravedad.⁴

El cáncer es causado por mutaciones, pero existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen, sobre todo, en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinativa. Sin embargo, algunos individuos han heredado mutaciones genéticas que los predisponen a desarrollar tipos específicos de cáncer. La segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino, más bien, de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones, según el tipo de cáncer, en genes que regulan la multiplicación celular normal. Las mutaciones ocasionan ganancia de función que activan oncogenes, los cuales son efectores positivos de la transformación maligna o bien inactivan genes supresores de tumores, los que son

reguladores negativos de crecimiento y la pérdida de su función promueve la carcinogénesis.⁴

Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: ellas y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales; e invaden y colonizan territorios comúnmente reservados para otras células. La combinación de estas características es lo que hace a los cánceres especialmente peligrosos. Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce ningún daño significativo, sean cuales sean las otras propiedades desagradables que pueda tener; pero si su proliferación está fuera de control, producirá una masa de células anormales creciendo inexorablemente, conocida como tumor o neoplasma. Sin embargo, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es benigno y generalmente puede conseguirse una curación completa extrayéndolo quirúrgicamente. Un tumor se considera canceroso sólo si es maligno, es decir, si sus células invaden al tejido circundante. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo. En la medida que un cáncer produce metástasis, es más difícil de erradicar.⁵ Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir de los que se originan, en:

- a. sarcomas: Crecen a partir de tejido conectivo y de soporte como los huesos, cartílago, nervio, músculo y grasa.
- b. Leucemias y linfomas: Incluyen cánceres que implican tejidos productores de sangre o hematopoyéticos.
- c. Carcinomas: Incluyen las formas más frecuentes de cáncer humano, se originan de tejido epitelial como la epidermis de la piel, la cubierta de cavidades y órganos del cuerpo y de tejido glandular como el de mama y próstata. Los carcinomas con una estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas, mientras que aquellos que parecen tejido glandular se llaman adenocarcinomas⁶.

CÁNCER DE MAMA

Más del 95% de las neoplasias mamarias derivan de los componentes epiteliales de la mama y corresponden a carcinomas, siendo más específicamente, adenocarcinomas. Sin embargo, dentro de este término se engloban diversos tipos de lesiones que poseen diferentes aspectos microscópicos y comportamientos.⁶ Siguiendo estos criterios los carcinomas mamarios pueden subdividirse en dos grandes grupos:

a. Cáncer de mama no invasivo (*in situ*). Cuando las células tumorales permanecen confinadas en la estructura ductal, en el lóbulo o no presenta una imagen microscópica que induzca a pensar en una invasión del estroma⁶, considerando diferencias morfológicas y bioquímicas a este tipo de lesiones se subdividen, a su vez, en:

- carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductal, su apariencia microoscópica es estereotípica.
- carcinoma lobular *in situ* su aspecto histológico y marcadores bioquímicos son heterogéneos.

b. Cáncer de mama invasivo. Se trata, con frecuencia, de tumores sólidos, de color grisáceo, constituyendo masas areniscas que invaden el tejido circundante, comprende un amplio número de lesiones muy heterogéneas, incluyendo:

- Carcinoma ductal infiltrante
- Carcinoma lobular infiltrante
- Otras variantes, medular, mucinoso o coloidal, tubular, papilar.

Los carcinomas ductales infiltrantes son los mas frecuentes y basándose en una serie de características morfocitológicas, se dividen en tres categorías⁶:

- bien diferenciado o grado I

- moderadamente diferenciado o grado II
- poco diferenciado o grado III

Por otra parte, los carcinomas lobulares de tipo infiltrante, menos frecuentes, se presentan a menudo de forma bilateral y con frecuencia son multicéntricos. Mientras algunos autores postulan que el pronóstico de ambos tipos de lesiones invasivas es similar, otros especulan que los casos de carcinoma lobular infiltrante poseen un pronóstico más favorable.

Las otras variantes del carcinoma de mama invasivo, poseen mejor pronóstico que los carcinomas ductales infiltrantes, por ejemplo, el pronóstico de los carcinomas medulares es más favorable que el de los carcinomas ductales infiltrantes con escasa diferenciación (grado III). Las variantes más inusuales de cáncer de mama invasivo son los carcinomas metaplásicos y los carcinomas quísticos adenoides. Existen algunas características histológicas del cáncer de mama que han sido relacionadas con un peor pronóstico. Entre éstas destacan el grado histológico y la afectación ganglionar.⁶

Tradicionalmente el desarrollo del cáncer se ha asociado a la exposición a agentes químicos o víricos. Sin embargo, también los factores de crecimiento o las hormonas, ya sean estas endógenas o exógenas, actúan promoviendo la división celular lo que incrementa la posibilidad de que aparezcan mutaciones debidas al azar. Este es el caso de algunos tipos de cáncer de mama, del cáncer de tiroides, ovario, próstata, endometrio, testículo y algún sarcoma óseo. En general, la aparición de un fenotipo maligno depende de una serie de mutaciones somáticas que tienen lugar durante la división celular. En el caso del cáncer de mama existen multitud de genes susceptibles de sufrir estas alteraciones. Entre éstos se identifican los genes que participan en la regulación endocrina, aquellos implicados en la reparación del DNA, genes supresores de tumores y, por último, los oncogenes. Existen, además, factores de riesgo y, en contraposición, factores preventivos que deben ser tomados en cuenta en la valoración del cáncer de mama, a continuación describiremos algunos de ellos.⁷

Niveles de estrógenos

A mayor edad el epitelio mamario ha estado mas tiempo expuesto a las hormonas. Los niveles hormonales caen radicalmente tras la menopausia pero, aún así, se ha comprobado que aquellas mujeres que padecen cáncer de mama después de la menopausia poseen niveles de estrógenos superiores a los de la media de su edad.

Edad de la menarquia

Los estudios llevados a cabo en adolescentes han demostrado que el riesgo de padecer cáncer de mama decrece en un 20% por cada uno de los años en que se retrasa la menarquia.

Menopausia

Una menarquia temprana asociada a una menopausia tardía incrementa el número de ciclos ovulatorios y por lo tanto el tiempo en el que la mujer está expuesta a elevados niveles de estrógenos. Siguiendo este criterio, las mujeres cuya menopausia tiene lugar a una edad inferior a 45 años poseen un 50% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas cuya menopausia tiene lugar después de los 55 años.

Lactancia

Una lactancia más duradera acarrea un menor riesgo de padecer cáncer de mama debido a que ésta es una etapa anaovulatoria en la que los niveles de estrógenos son reducidos y por lo tanto el desarrollo tumoral no está favorecido.

Embarazo

También la edad del primer embarazo, así como el tiempo que transcurre entre embarazos altera la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. En este sentido, se ha observado que las madres primerizas a una edad inferior a 20 años tienen la mitad de riesgo de padecer una patología mamaria que las primerizas a edades más tardías. El riesgo es aún mayor en las primíparas mayores de 30 años. Las probabilidades de padecer cáncer de mama se triplican en las mujeres cuyos

embarazos son muy sucesivos, al igual que ocurre con las mujeres que sufren sucesivos abortos durante el primer trimestre de gestación, debido a las frecuentes oscilaciones hormonales.

Terapias hormonales sustitutivas

Estos tratamientos, aplicados con el fin de reducir los efectos de la menopausia, han demostrado poseer efectos secundarios que incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Los tratamientos hormonales por mucho tiempo, trataban de restablecer los niveles de estrógenos. Debido a ello, el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementaba 2.5 veces por cada uno de los años en que se había seguido este tratamiento. Sin embargo la combinación con progesterona, disminuye dicho riesgo.

Historia familiar y predisposición hereditaria

Una historia familiar en la que exista un caso de cáncer de mama incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Éste es aún mayor en el caso de que esta pariente sea de primer grado, haya sufrido la enfermedad muy joven, además de haberla padecido de forma bilateral. Mutaciones germinales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, junto con las de *p53* y las del gen *ATM*, han demostrado ser frecuentes en este tipo de patología. El cáncer hereditario representa el 10% de los cánceres de mama y se ha especulado que es la combinación de factores genéticos y ambientales la que altera la penetrancia y expresión de este tipo de genes, que se estudian con más detalle con posterioridad.

Dieta

Los múltiples estudios llevados a cabo sobre este aspecto han demostrado la existencia de una relación entre la alimentación y el desarrollo del cáncer. En el caso del cáncer de mama se ha observado que existe una correlación positiva entre la ingesta de grasas y la predisposición a padecer la enfermedad. También se correlaciona con el consumo de alcohol; ya que éste incrementa los niveles plasmáticos de estrógenos. Por el contrario, el consumo de fibra resulta beneficioso al reducir la reabsorción de los estrógenos liberados por la vesícula

biliar. En la actualidad, se están valorando los beneficios del consumo de soya, y más concretamente de los fitoestrógenos que contiene, se especula que actúan como antagonistas de los estrógenos endógenos.

ETAPAS DEL CANCER DE MAMA.

El cáncer de mama se clasifica en cuatro etapas con base al tamaño del tumor y si es o no invasivo. Las etapas son:

Etapa 0

Alrededor del 15%-20% de las neoplasias mamarias son tempranas, también llamadas carcinomas *in situ*. Existen 2 tipos de cáncer de mama *in situ*, el carcinoma intraductal y el carcinoma lobular. Este último no es un cáncer, pero para fines de clasificación se le llama carcinoma *in situ* o cáncer de mama etapa 0. Las pacientes con esta condición tienen una probabilidad del 25% de desarrollar cáncer de mama en cualquiera de las mamas en los próximos 25 años.

Etapa I

El cáncer no mide más de 2 centímetros y no se ha extendido fuera de la mama.

Etapa II

Se divide en etapa IIA y IIB.

La etapa IIA se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

El cáncer no mide más de 2 centímetros pero se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo del brazo (los ganglios linfáticos axilares)

El cáncer mide entre 2-5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

La etapa IIB se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

El cáncer mide entre 2-5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

El cáncer mide más de 5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

Etapa III

Se divide en etapa IIIA y IIIB.

La etapa IIIA se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

El cáncer mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y estos están unidos entre sí o a otras estructuras.

El cáncer mide más de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

La etapa IIIB se reconoce por cualquiera de las siguientes características:

El cáncer se ha diseminado a tejidos cerca de la mama (la piel o la pared torácica, incluyendo las costillas y los músculos del tórax)

El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.

Etapa IV

El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia a los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro; o el tumor se ha diseminado localmente a la piel y a los ganglios linfáticos dentro del cuello, cerca de la clavícula.⁸

FACTORES DE CRECIMIENTO Y CANCER

Los factores de crecimiento se definen como polipéptidos que modulan la proliferación celular a través de la unión con receptores específicos de alta afinidad localizados en la membrana celular, desencadenando una cascada de señales bioquímicas que resultan en la activación o represión de la expresión de distintos genes. Además, el descubrimiento de que los productos de ciertos oncogenes eran homólogos estructuralmente de ciertos factores de crecimiento y sus receptores, ha conducido a atribuirles un papel fundamental en la

transformación celular y carcinogénesis. Según su acción final, los factores mitogénicos pueden clasificarse como factores de “competencia” (PDGF, FGF) que impulsan el avance desde Go a G1 y factores de “progresión” (EGF, IGF-I, TGF- α) que son necesarios para la replicación y, por tanto, responsables de la transición G1/S. Existen además factores inhibidores como TGF- β , interferones o TNF, que pueden antagonizar los efectos proliferativos de los factores mitogénicos.⁹

Gran parte de la importancia de los factores de crecimiento se debe a su implicación en el proceso neoplásico. Las células transformadas muestran un descenso en el requerimiento de suero para crecer, es decir, no necesitan de factores de crecimiento exógenos y este fenómeno podría estar mediado por la activación de la síntesis de factores de crecimiento endógenos, la síntesis de receptores alterados para estos factores de crecimiento o por la activación de algún mecanismo post-receptor que sustituya la necesidad de factores de crecimiento. Varios oncogenes virales identificados por transfección representan formas alteradas de genes celulares que codifican receptores de factores de crecimiento de la familia tirosina-cinasa. A este respecto, existe una clara evidencia de que el oncogén v-erbB codifica una versión truncada del receptor de EGF (EGFR) que contiene únicamente la región transmembrana y el dominio asociado con la actividad de tirosina-cinasa, implicado en la estimulación de la proliferación celular, ésto conduce a que el receptor se encuentre permanentemente activado sin la necesidad de la unión del ligando.¹⁰

Como ya se ha apuntado brevemente, las células cancerosas requieren menos factores de crecimiento exógenos para su óptimo crecimiento y multiplicación con respecto a las células normales. Para explicar este fenómeno se postula que esas células podrían llegar a ser malignas por la producción endógena de factores de crecimiento polipeptídicos que actúan sobre las células que los secretan vía receptores funcionales permitiendo la expresión fenotípica del péptido por la misma célula que lo ha producido. Este proceso se ha denominado secreción

autocrina, y ha llegado a ser el concepto fundamental que relaciona a oncogenes con factores de crecimiento. Los oncogenes confieren autonomía de factores de crecimiento a las células, no sólo codificando directamente factores de crecimiento autocrinos, sino también amplificando las señales mitogénicas generadas por ellos. Según esta hipótesis autocrina, y teniendo en cuenta que existen factores de crecimiento tanto estimuladores como inhibidores, se puede postular que la transformación maligna es el resultado no sólo de la excesiva producción, expresión y acción de factores autocrinos positivos, sino también del fracaso de las células para sintetizar, expresar o responder a factores negativos específicos que las células liberan normalmente para controlar su propio crecimiento.¹¹

Además, la hipótesis autocrina podría explicar el control del crecimiento en células de cáncer de mama hormono-dependiente de forma que estas células secreten en respuesta a estrógenos, niveles elevados de factores de crecimiento mitogénicos y niveles bajos de factores inhibidores. El efecto de los antiestrógenos sería el contrario, es decir, incrementar la producción de factores inhibidores e inhibir la secreción de mitógenos. Por otra parte, las células hormono-independientes, podrían expresar de forma constitutiva altos niveles de factores mitogénicos en ausencia de estrógenos y de esta forma ser independientes a la acción hormonal.

Las células epiteliales de cáncer de mama son capaces de secretar *in vitro* factores de crecimiento, entre los que se incluyen los factores de crecimiento transformantes (TGF- α , TGF- β), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), ente otros. La secreción de TGF- α e IGF-I es estimulada por estrógenos, fundamentando la posibilidad de que los efectos mitogénicos de los estrógenos sean indirectos y mediados por cambios en la secreción de factores de crecimiento.¹²

RECEPTORES DE FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO Y CÁNCER

Los receptores con función de tirosina cinasa juegan un papel importante en la integración e interpretación de estímulos externos, y permiten a la célula interactuar adecuadamente con su ambiente, acoplando las señales externas con vías de señalización internas. Alteraciones en la expresión y activación de receptores tirosina cinasa, así como sus ligandos y moléculas de señalización intracelular juegan un rol fundamental en el desarrollo de cáncer¹³.

Los factores de crecimiento fibroblástico son una familia de ligandos que señalizan por medio de receptores tirosina cinasa, a través de la activación de sus receptores (FGFR) se estimula la mitogénesis, diferenciación, proliferación, migración, y angiogénesis y su inadecuada expresión ha sido implicada en la carcinogenesis y el cáncer de mama¹⁴. Algunas isoformas de sus receptores, son expresadas en células epiteliales, mientras que otras lo hacen en células mesenquimales, los ligandos para los receptores epiteliales, frecuentemente son expresados en las células mesenquimales y viceversa; esto permite una señalización en forma paracrina entre tejidos adyacentes sugiriendo un mecanismo para interacciones epitelio-mesenquima¹⁵. Por ejemplo FGFR2IIIb expresado en el epitelio puede ser activado por los FGFs 7 y 10 producidos en el mesénquima, los cuales no muestran actividad hacia FGFR2IIIc que se encuentra en el mesénquima. Inversamente FGF8 actúa sobre FGFR2IIIc pero no lo hace sobre FGFR2IIIb.¹⁶

La estructura de los receptores de factores de crecimiento fibroblástico consiste en: una porción extracelular de unión a ligando, compuesta a su vez de tres dominios de tipo inmunoglobulina (dominios 1, 2 y 3), de un dominio transmembranal y un dominio intracelular con función de tirosina cinasa. En los FGFR 1, 2 y 3 eventos de “splicing” conducen a la formación de diversas isoformas. Los receptores carentes de los dominios 1 y 2 son capaces de unirse a otros FGFR y transmitir una respuesta biológica en forma independiente al ligando. Las isoformas mesenquimales de los FGFR 1, 2 y 3 (IIIc) y epiteliales (IIIb)¹⁷ se forman por “splicing” conducente a que se exprese uno de 2 exones

alternativos que codifican la segunda mitad del dominio 3 (IIIb y IIIc) y se empalme con el exón común IIIa, que codifica la primera mitad de dicho dominio, en una manera mutuamente excluyente.

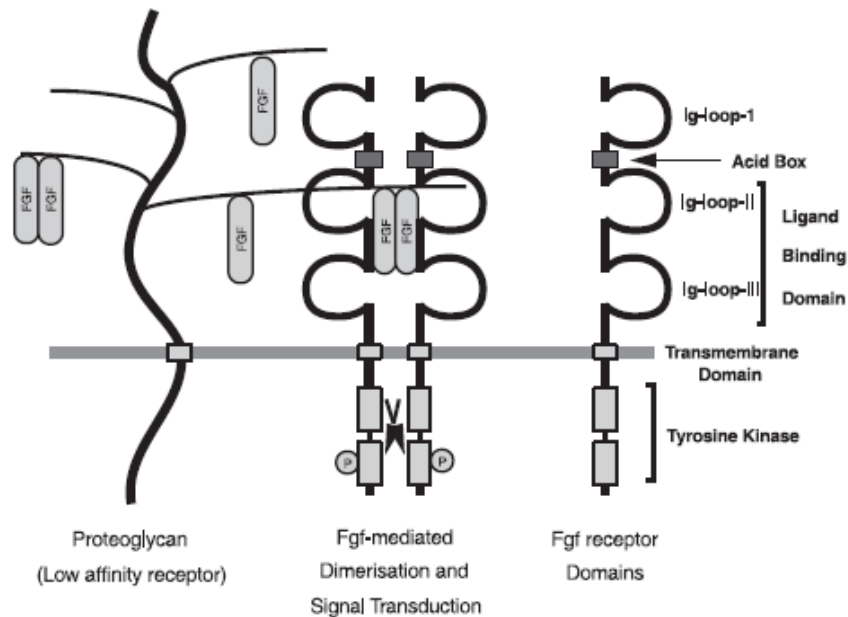


Figura 3. Estructura de un receptor del factor de crecimiento fibroblástico.

En tejido mamario normal se han encontrado 2 isoformas de FGFR3. Una que se sitúa predominantemente en el núcleo, en la que se conserva el dominio de tirosina cinasa pero se pierden parte del dominio 3 y el dominio transmembranal, como resultado del “splicing” de los exones 7 y 8. También se ha encontrado la isoforma IIIb la cual algunas veces esta en el núcleo¹⁸. Estudios inmunohistoquímicos en tumores mamarios humanos asocian la localización nuclear del FGFRIIIb junto con su ligando el FGF1 con un fenotipo maligno de cáncer de mama.¹⁹

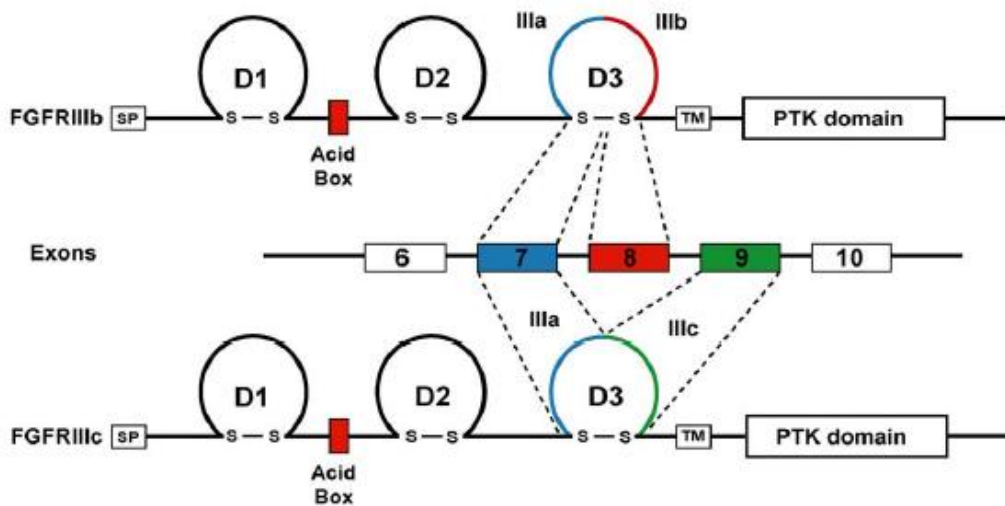


Figura 4. Esquema del Splicing alternativo. Ocurre en el dominio 3 de inmonoglobulina del receptor en el cual se alternan los exones 8 y 9, para dar los fenotipos epitelial y mesenquimal respectivamente.

Se ha demostrado además la importancia de los FGFRs en la sobrevivencia y proliferación celular; por ejemplo, embriones carentes de FGFR2IIIb no tienen extremidades o pulmones debido a la pérdida de sus células progenitoras por apoptosis.²⁰ La transfección de células de mieloma múltiple con un mutante de FGFR3 activado constitutivamente, conduce a una disminución de la apoptosis y aumento y dependencia de la respuesta proliferativa a interleucina 6 (IL-6); la sobreexpresión del tipo silvestre de FGFR3 también lleva a un aumento de proliferación y sobrevivencia, ambos tipos mostraron un incremento en la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT-3) y altos niveles de Bcl-X_L.²¹ La inhibición de FGFR3 mediante siRNA en células de mieloma múltiple disminuye la expresión a nivel de proteínas de Bcl-2 y Mcl-1, mientras que el análisis por microarreglos muestra una disminución de la expresión de los genes antiapoptóticos Bcl-2, Mcl-1, CFLAR, y algunos miembros de la familia NF-kB y un incremento en la expresión de genes proapoptóticos como CYC, BID, CASP2 y CASP6.²²

JUSTIFICACIÓN

El epitelio mamario, cuyo crecimiento es regulado por hormonas esteroides endógenas puede dar lugar a tumores que como en el tejido parental, su crecimiento es también dependientes de hormonas esteroides. Sin embargo, el crecimiento de estos tumores puede volverse independiente de las hormonas esteroides, limitando la eficacia de las terapias anti-hormonales para su tratamiento, esto ocurre principalmente en cáncer de mama y de próstata. Una hipótesis para explicar la progresión a la independencia de esteroides es que el tumor adquiere la capacidad constitutiva de expresar factores de crecimiento autocrinos inducidos previamente por las hormonas esteroides, entre ellos, los FGFs que son capaces de conferir la independencia a los esteroides.²³

Hay fuertes evidencias de la implicación de los FGFs y sus receptores en cáncer mamario murino y en líneas celulares de cáncer de mama, sin embargo para la enfermedad en humanos, la evidencia es menor y muchas veces el entendimiento de la misma se basa en analogías con los modelos murinos. Por lo cual es importante realizar más estudios de la expresión de estos factores de crecimiento en humanos para un posible uso como elementos de pronóstico, diagnóstico y/o tratamiento en el cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Los tumores mamarios presentan una mayor expresión de FGFR-1 en comparación con los tejidos mamarios sanos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el grado de expresión del receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1 en tumores mamarios de mujeres mexicanas, así como su posible relación con la etapa del tumor.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la expresión de FGFR-1 por PCR.

Cuantificar por PCR en tiempo real los transcritos para FGFR-1.

Analizar si el grado de expresión del FGFR-1 depende de la etapa del tumor

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

Los tejidos se obtuvieron en el hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se utilizaron 15 tumores esporádicos, vírgenes a tratamiento en estadios II y III de cáncer de mama y como control o referencia, 5 tejidos mamarios normales de mujeres mexicanas clínicamente sanas, de entre 24 y 39 años provenientes de cirugías plásticas de implantes y reducción de mamas. Las muestras de tumor obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C . Estas se validaron por patólogos para que al menos tengan un 70% de células cancerosas. Como grupo control se utilizaron tejidos mamarios sanos (Tabla 2).

CULTIVO CELULAR.

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron se cultivaron en medio RPMI-1640 (SIGMA Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), 100 U/ml de penicilina (SIGMA Aldrich), 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (SIGMA Aldrich) e incubadas a 37°C con 5% de CO_2 y 100% de atmósfera humedad relativa. Todas las soluciones que se utilizaron en el cultivo fueron esterilizadas por filtración con membranas de 0.22 μm . Cuando se obtuvo un 75%-80% de confluencia, las células fueron despegadas con una solución de tripsina-EDTA, y posteriormente se realizó la extracción de RNA para utilizarlo como control positivo en los ensayos de RT-PCR y RT-PCR en Tiempo Real.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA

El RNA de cada muestra se obtuvo por el método de trizol (GIBCO) y fue disuelto en agua libre de RNasas. Las muestras se almacenaron a -70°C , la integridad y pureza fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 2 %; la cuantificación se realizó en el Biophotometer (Eppendorf).

TRANSCRIPCION REVERSA

El cDNA fue sintetizado en una reacción de 20 µl conteniendo 1 µg de RNA total, utilizando el equipo “SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR”

RT-PCR EN TIEMPO REAL Y FINAL.

Para la amplificación del cDNA, se emplearon oligonucleotidos específicos para el FGFR-1 según lo reportado por Tomlinson y Cols.²⁴, éstos fueron: hacia adelante, 5' aggctacaaggctccggtatgc 3', reverso, 5' tgccgtactcattctccacaa 3' (Figura 11) flanqueando desde el nucleótido 1553 al 1654, región comprendida entre los exones 5 y 6; y como gen constitutivo de referencia se utilizó la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT por sus siglas en inglés), los oligonucleotidos específicos para este gen fueron: hacia adelante, 5' gacactggcaaaacaatgca 3'; reverso, 5' cttcgtggggctcctttcacc 3', los cuales están comprendidos entre el nucleótido 579 y 679 abarcando parte de los exones 6 y 7 del gen (Figura 12).

El PCR en Tiempo Real se realizó utilizando el sistema de detección “Corbett Rotor Gene 3000 Real-Time DNA” (Corbett Research) con detección del producto utilizando el colorante SYBR Green I. A partir de RNA total aislado de las células tumorales y no afectadas. La amplificación se efectuó utilizando los oligonucleótidos específicos a la secuencia del gen FGFR-1, en una reacción de 25 µl, conteniendo 2 µl de cDNA total, 6 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada iniciador. La reacción fue incubada a 95° C por 10 min. El sistema fue programado como sigue: 40 ciclos de tres segmentos para amplificación (15 seg. a 95° C, 30 seg. a 60° C, 15 seg. a 95°), la adquisición de señal es continua de 60 a 95 °C). La temperatura de la tasa de transición para todos los segmentos de los ciclos de amplificación y el ciclo de la curva de desnaturalización se colocó a 20° C/seg excepto la que es colocada a 0.1° C/seg para el segmento 3 del análisis del producto de desnaturalización. La temperatura de adquisición de señal se fijo igual a la *T_m* del

producto específico +/- 1 ó 2° C. Como control negativo se utilizaron todos los componentes de la reacción exceptuando el molde (RNA).

ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICO

Los datos de RT-PCR en tiempo real se presentan como valores de ciclo umbral (Ct), donde Ct es el número de ciclo durante el proceso de amplificación en el que la fluorescencia pasa el umbral. El nivel de expresión del gen FGFR-1 fue calculado en los tejidos tumorales y sanos, normalizando con el gen de expresión constitutiva HPRT de cada tejido para asegurar que las variaciones observadas en expresión sean realmente debidas a cambios de expresión y no a cantidades variables de muestra.

La cuantificación relativa se realizó con el método comparativo ΔCt y $\Delta\Delta Ct$.

Se usaron los siguientes cálculos para determinar la expresión relativa de FGFR-1 en cada tejido.

$$1) \quad \Delta Ct = Ct_{FGFR1} - Ct_{HPRT}$$

$$2) \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra\ de\ interés} - \Delta Ct_{calibrador}$$

En donde las muestras de interés son cada uno de los tumores y el calibrador es la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar las diferencias de expresión, que en este caso se trató del promedio de ΔCt de los tejidos sanos.

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de T de Student con un nivel de significancia del 0.05, utilizando el programa SPSS 17 para Windows.

RESULTADOS.

MUESTRAS DE TUMORES MAMARIOS.

Se estudiaron 15 tumores mamarios, 13 pertenecientes al tipo ductal infiltrante y 2 lobulillar infiltrante, los cuales provenían de mujeres mexicanas de entre 40 y 78 años, con las características que se muestran en la Tabla 1.

	Muestra	Edad	Tipo de carcinoma	Etapa	Clasificación	HER-2	R. Estrogenos	R. Progesterona
1	M3	78	Ductal infiltrante	EC IIB	T4N2M0	Neg.	Neg.	Neg.
2	M5	67	Lobulillar infiltrante	EC IIB	T2N1M0	Neg.	90%	90%
3	M7	54	Ductal infiltrante	EC IIB	T3N1M0	Neg.	Neg.	Neg.
4	M9	42	Ductal infiltrante	EC IIB	T2N3M0	Neg.	Neg.	Neg.
5	M11	64	Lobulillar infiltrante	EC IIA	T2N0M0	Neg.	100%	10%
6	M16	60	Ductal infiltrante	EC IIB	T2N1M0	Neg.	90%	90%
7	M17	66	Ductal infiltrante	EC IIA	T2N0M0	Neg.	Neg.	Neg.
8	M18	52	Ductal infiltrante	EC IIB	T2N1M0	Neg.	Neg.	Neg.
9	M19	65	Ductal infiltrante	EC IIB	T3N0M0	Neg.	90%	90%
10	M81	46	Ductal infiltrante	EC IIB	T4N2M0	Neg.	80%	80%
11	M83	42	Ductal infiltrante	EC IIA	T2N0M0	Neg.	40%	30%
12	M84	40	Ductal infiltrante	EC IIB	T2N1M0	Neg.	90%	90%
13	M87	41	Ductal infiltrante	EC IIB	T3N1M0	ND	ND	ND
14	M88	69	Ductal infiltrante	EC IIB	T2N1M0	Neg.	50%	50%
15	M89	53	Ductal infiltrante	EC IIA	T2N0M0	Neg.	30%	Neg.

Tabla 1. Características de los tejidos tumorales analizados.

La edad de las pacientes de quienes provenían las muestras de tejidos sanos se muestra en la tabla 2. (nota: se describía como método)

Muestra	Edad
S2	36
S3	39
S4	34
S5	24
S6	34

Tabla 2. Edades de las donadoras de los tejidos sanos utilizados.

Las muestras obtenidas se clasificaron según el tipo y etapa del tumor, así como la distribución por edades. De los 15 tumores 13 correspondieron a carcinoma ductal infiltrante y dos al carcinoma lobulillar infiltrante, de todos ellos 4 se encontraron en etapa II A, 6 en etapa II B y 3 en etapa III B (Tabla 3).

Etapa del tumor	N. de tumores
II A	4
II B	6
III B	5

Tabla 3. Distribución de tumores por etapa.

En el caso de la distribución por edades se consideraron 3 grupos de edad, el primero de 20 a 40 años, el segundo de 40 a 60 años y el tercero mayor de 60 años. De estos un tumor clasificación II A se considero en el grupo de 20 a 40 años; 5 tumores en el grupo de 40 a 60, de los cuales uno correspondió a la etapa II A, otro a la etapa IIB y 3 a la etapa IIIB; y 7 tumores en el grupo mayor de 60 años 2 tumores se clasificaron en etapa IIA y 5 en IIB (Tabla 4).

Edad	Etapa IIA	Etapa IIB	Etapa IIIB
20-40 años	0	1	0
40-60 años	2	1	4
Mas de 60 años	2	4	1

Tabla 4. Clasificación de tumores por etapa y edad.

EXTRACCION DE RNA.

Todas las muestras de RNA presentaron una buena calidad al evaluarse por electroforesis y espectrofotométricamente (figuras 5, 6, 7 y 8, tabla 5).

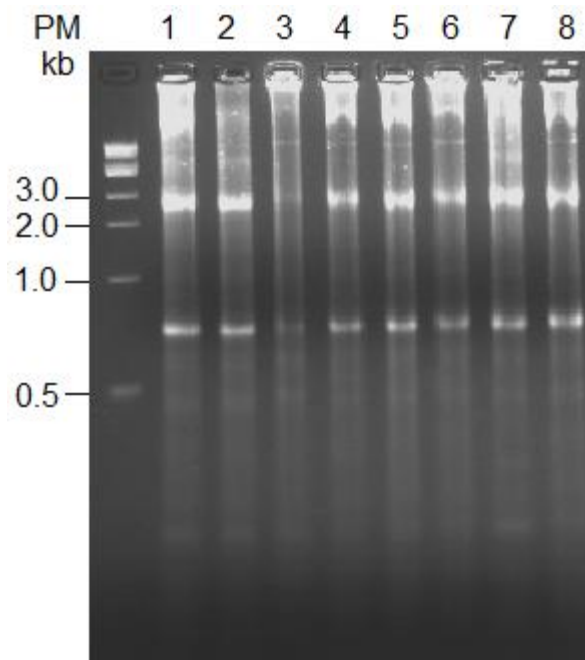


Figura 1. Productos de extracción de RNA total de tejido mamario tumoral. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los extractos de RNA total por el método de trizol. Carriles PM, 1 kb; 1, M8; 2, M9; 3, M12; 4, M17; 5, M18; 6, M19; 7, M84; 8, M88.

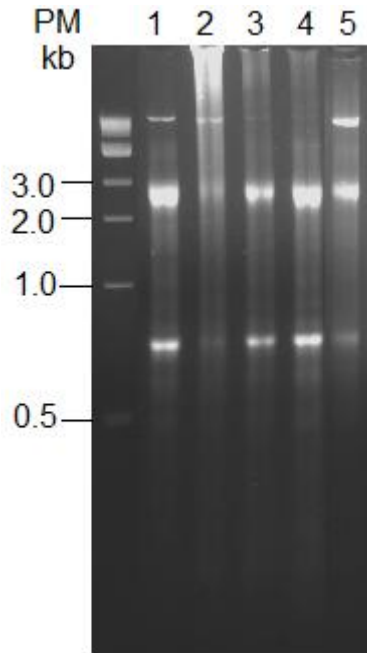


Figura 2. Productos de la extracción de RNA total por el método de trizol de muestras de tejido tumoral mamario. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, cargando un 1 microgramo de muestra. Carriles PM, 1 kb; 1, M5; 2, M6; 3, M81; 4, M83; 5, M7.

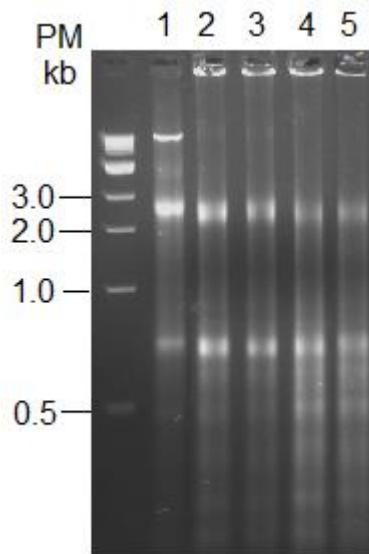


Figura 3. Productos de extracción de RNA total de tejido mamario sano. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los extractos de RNA total por el método de trizol. Carriles: PM, 1 kb; 1, S2I; 2, S3I; 3, S4I; 4, S5; 5, S6I.

	Muestra	Edad	Tipo de carcinoma	Etapa	ABSORBANCIA 260/280
1	M3	78	Ductal infiltrante	EC IIIB	1.90
2	M5	67	Lobulillar infiltrante	EC IIB	1.87
3	M7	54	Ductal infiltrante	EC IIIB	2.03
4	M9	42	Ductal infiltrante	EC IIIB	2.01
5	M11	64	Lobulillar infiltrante	EC IIA	1.90
6	M16	60	Ductal infiltrante	EC IIB	1.92
7	M17	66	Ductal infiltrante	EC IIA	2.11
8	M18	52	Ductal infiltrante	EC IIB	1.65
9	M19	65	Ductal infiltrante	EC IIB	2.04
10	M81	46	Ductal infiltrante	EC IIIB	1.80
11	M83	42	Ductal infiltrante	EC IIA	1.84
12	M84	40	Ductal infiltrante	EC IIB	1.77
13	M87	41	Ductal infiltrante	EC IIIB	1.95
14	M88	69	Ductal infiltrante	EC IIB	2.10
15	M89	53	Ductal infiltrante	EC IIA	1.98

Tabla 5. Relación de absorbancias 260/280 de los extractos de RNA de las muestras de mama. Esta relación indica la pureza del RNA, se considera que las unidades cercanas a 2.0 de densidad óptica son las adecuadas.

EXPRESIÓN DE FGFR-1 EN CULTIVOS CELULARES

La línea celular de cáncer de mama por antonomasia es la MCF-7, desarrollada en 1973 a partir de un derrame pleural de un carcinoma de mama humano, ésta se utilizó como control positivo de patología hormono-dependiente, por su parte la línea MDA-MB-231 constituye uno de los modelos más utilizados para el estudio in vitro del cáncer de mama. Estas células presentan gran cantidad de receptores para el EGF y el TGF- β 1, pero carecen de receptores para el estradiol (E2).

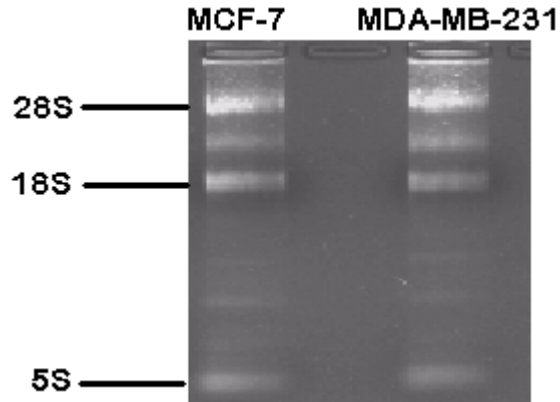


Figura 4. Productos de extracción de RNA total de células MCF-7 y MDA-MB-23. Se les realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio a los extractos de RNA total por el método de trizol.

Las células MCF-7 crecieron en cultivo en forma de grupos de células birrefringentes, las cuales se extendían a lo largo de la botella de cultivo formando una especie de monocapa celular, el crecimiento fue en un solo plano y en su mayoría se adhirieron a la superficie de cultivo, lo cual fue necesario para su crecimiento, ya que después de 7 días de cultivo, no se apreciaron células libres en el medio (figura 9).

Las células MDA-MB-231, por su parte solo formaron grupos de pocas células, sin llegar a formar una monocapa, la mayoría de las células se adhirieron y extendieron sobre la caja de cultivo, manteniendo una morfología fusiforme, solo algunas permanecieron libres en el medio de cultivo (figura 10).

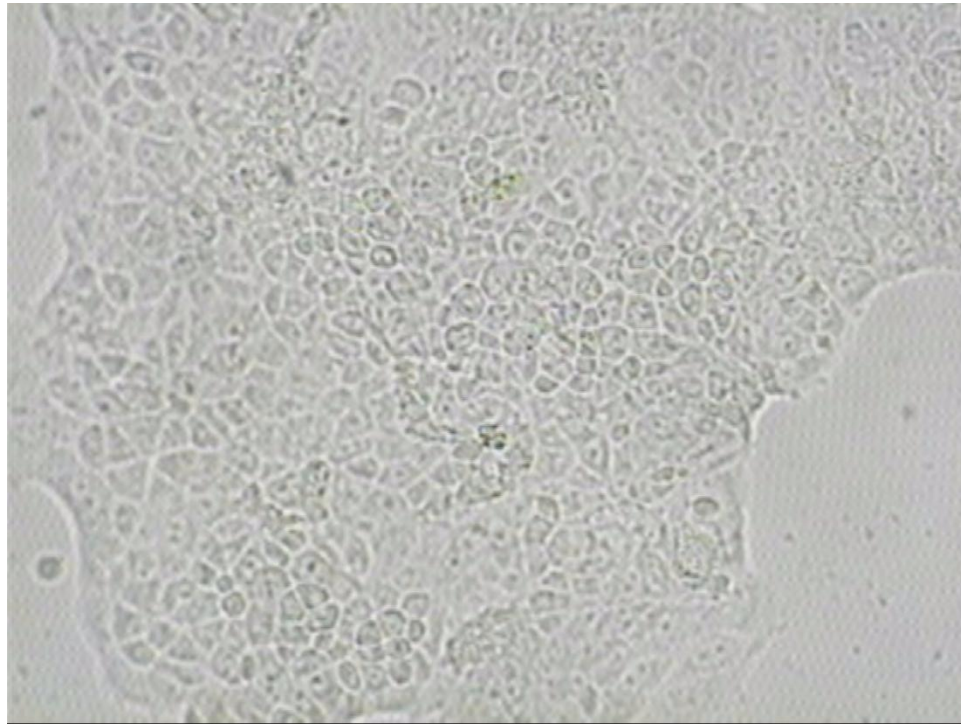


Figura 5. Imagen representativa del cultivo de la línea celular MCF-7 a los 7 días de cultivo.

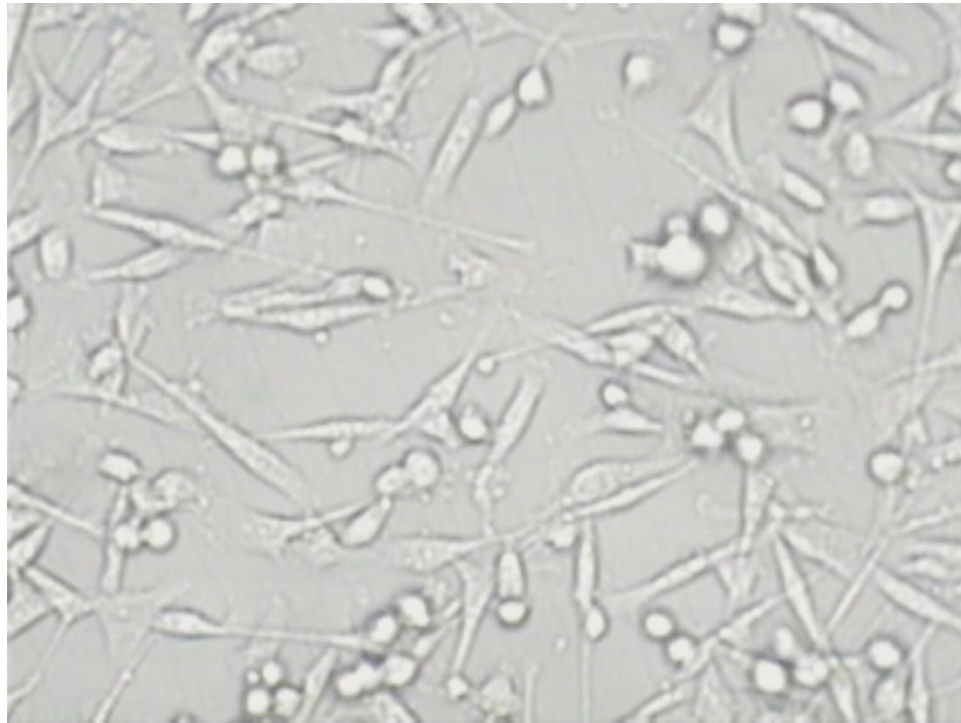


Figura 6. Imagen representativa del cultivo de la línea celular MDA-MB-231 a los 7 días de cultivo.

PCR TIEMPO FINAL PARA FGFR-1 Y HPRT

El cultivo celular se utilizó para estandarizar las técnicas de PCR y PCR Tiempo Real para FGFR-1.

SECUENCIA DEL GEN FGFR-1

```
1   agatgcaggg gcgcaaacgc caaaggagac caggctgtag gaagagaagg gcagagcgcc
61  ggacagctcg gcccgctccc cgtcctttgg ggccgaggct ggggaactac aaggcccagc
121 aggcagctgc agggggcgga ggcggaggag ggaccagcgc ggggaggagt gagagagcga
181 gccctcgcgc cccgccggcg catagcgctc ggagcgctct tgcggccaca ggcgcgcgct
241 cctcggcggc gggcggcagc tagcgggagc cgggacgccc gtgcagccgc agcgcgcgga
301 ggaacccggg tgtgccggga gctgggcgcc cacgtccgga cgggaccgag acccctcgta
361 gcgcattgcg gcgacctcgc cttccccggc cgcgagcgcg ccgctgcttg aaaagcccg
421 gaaccaaggg actttttctc ggtccgagct cggggcgccc cgcagggcgc acggtaccgc
481 tgctgcagtc gggcacgccc cggcgccggg gcctccgag ggcgatggag cccggtctgc
541 aaggaaagtg agggcgcgcc gctgcgttct ggaggagggg ggcacaaggt ctggagacc
601 cgggtggcgg acgggagccc tcccccgccc ccgctccgg ggcaccagct ccggtccat
661 tgttcccggc cgggtggag gcgccgagca ccgagcgccc ccgggagtgc agcgcggg
721 gcggagctct tgcgacccc ccaggaccgc aacagagccc gggggcgccg ggccggagcc
781 ggggacgcgg gcacacgccc gctcgcacaa gccacggcgg actctcccga ggcggaacct
841 ccacgcccag cgagggtcag tttgaaaagg aggatcgagc tcactgtgga gtatccatgg
901 agatgtggag cctgtgcacc aacctctaac tgcagaactg ggatgtggag ctggaagtgc
961 ctctcttctt gggctgtgct ggtcacagcc acactctgca ccgctaggcc gtccccgacc
1021 ttgctgaac aagcccagcc ctggggagcc cctgtggaag tggagtccct cctggtccac
1081 cccggtgacc tgctgcagct tcgctgtcgg ctgcgggacg atgtgcagag catcaactgg
1141 ctgcgggacg ggtgacagc ggcggaagc aaccgcacc gcacacaggg gaggaggtg
1201 gaggtgcagg actccgtgcc cgcagactcc ggctctatg cttgcgtaac cagcagcccc
1261 tcgggcagtg acaccaccta cttctccgct aatgtttcag atgctctccc ctctcggag
1321 gatgatgatg atgatgatga ctctcttcca gaggagaaag aaacagataa caccaacca
1381 aaccgtatgc ccgtagctcc atattggaca tccccagaaa agatggaaaa gaaattgcat
1441 gcagtgcggg ctgccaagac agtgaagtcc aaatgccctt ccagtgggac ccaaaccctc
1501 acactgcgct ggttgaaaaa tggcaaagaa ttcaaacctg accacagaat tggaggctac
1561 aaggtccggt atgcaacctg gagcatcata atggactctg tgggtgccctc tgacaagggc
1621 aactacacct gcaatgtgga gaatgagtac ggcaatgcatca accacacata ccagctggat
1681 gtcgtggagc ggtcccctca ccggcccac ctgcaagcag ggttgcccgc caacaaaaca
1741 gtggccctgg gtagcaacgt ggagttcatg tgtaagggtg acagtgacct gcagccgcac
1801 atccagtggc taaagcacat cgagggtgaat gggagcaaga ttggcccaga caacctgct
1861 tatgtccaga tcttgaagac tgctggagtt aataaccacc acaaagagat ggaggtgctt
1921 cacttaagaa atgtctcctt tgaggagcga ggggagtata cgtgcttggc gggtaactct
1981 atcggactct cccatcactc tgcatggttg accgttctgg aagccctgga agagagcccg
2041 gcagtgatga cctcgcctct gtacctggag atcatcatct attgcacagg ggccttctc
2101 atctcctgca tgggtggggtc ggtcatcgtc tacaagatga agagtggtag caagaagagt
2161 gacttcacac gccagatggc tgtgcacaag ctggccaaga gcatccctct gcgcagacag
2221 gtaacagtgt ctgctgactc cagtgcattc atgaactctg gggttcttct ggttcggcca
2281 tcacggctct cctccagtgg gactcccatt ctagcagggg tctctgagta tgagcttccc
2341 gaagaccctc gctgggagct gcctcgggac agactggctc taggcaaacc cctgggagag
2401 ggctgctttg ggcaggtggt gttggcagag gctatcgggc tggacaagga caaacccaac
2461 cgtgtgacca aagtggctgt gaagatggtg aagtccgacg caacagagaa agacttgtca
2521 gacctgatct cagaaatgga gatgatgaag atgatcggga agcataagaa tatcatcaac
2581 ctgctggggg cctgcacgca gtaggtccc ttgtatgtca tcgtggagta tgectccaag
2641 ggcaacctgc gggagtacct gcaggcccgc agggccccag ggctggaata ctgctacaac
2701 ccagccaca acccagagga gcagctctcc tccaaggacc tgggtgctcg cgcctaccag
2761 gtggcccag gcgaggtgta tctggcctcc aagaagtgca tacaccgaga cctggcagcc
2821 agaatgtcc tggtagacaga ggacaatgtg atgaagatag cagactttgg cctcgcacgg
2881 gacattcacc acatcgacta ctataaaaag acaaccaacg gccgactgcc tgtgaagtgg
2941 atggacccc aggcattatt tgaccggatc tacaccacc agagtgatgt gtggctcttc
3001 ggggtgctcc tgtgggagat cttcactctg ggcggctccc cataccccgg tgtgctgtg
3061 gaggaacttt tcaagctgct gaaggagggt caccgcatgg acaagcccag taactgcacc
3121 aacgagctgt acatgatgat cggggactgc tggcatgcag tgccctcaca gagaccacc
```

```

3181 ttcaagcagc tgggtgaaga cctggaccgc atcgtggcct tgacctcaa ccaggagtac
3241 ctggacctgt ccatgcccct ggaccagtac tccccagct tccccgacac ccggagctct
3301 acgtgctcct caggggagga ttccgtcttc tctcatgagc cgctgcccga ggagccctgc
3361 tgcccccgac acccagccca gcttgccaat ggcggactca aacgcgcgtg actgccaccc
3421 acacgccttc cccagactcc accgtcagct gtaaccctca cccacagccc ctgctgggcc
3481 caccacctgt cegtccctgt cccctttcct gctggcagga gccggctgccc taccaggggc
3541 cttcctgtgt ggctgcctt caccacctc agctcacctc tccctccacc tcctctccac
3601 ctgctggtga gaggtgcaaa gaggcagatc ttgctgcca gccacttcat cccctcccag
3661 atgttgacc aacaccccct cctgccacca ggcactgcct ggagggcagg gagtgggagc
3721 caatgaacag gcatgcaagt gagagcttcc tgagctttct cctgtcgggt tggctctggt
3781 tgccttcacc cataagcccc tcgcactctg gtggcaggtg cctgtcctc agggctacag
3841 cagtaggag gtcagtgctt cgtgcctcga ttgaaggtga cctctgcccc agataggtgg
3901 tgccagtggc ttattaattc cgatactagt ttgctttgct gaccaaattc ctggtaccag
3961 aggatggtga ggcaaggcc aggttggggg cagtgttggt gccctggggc ccagcccaa
4021 actgggggct ctgtatatag ctatgaagaa aacacaaagt gtataaatct gagtatatat
4081 ttacatgtct ttttaaaagg gtcgttacca gagatttacc catcgggtaa gatgctcctg
4141 gtggctggga ggcacagtt gctatatatt aaaaacaaaa aagaaaaaaa aggaaaatgt
4201 ttttaaaaag gtcatatatt ttttgctact ttgctggtt tattttttta aattatgttc
4261 taaacctatt ttcagtttag gtcctcaat aaaaattgct gctgcttcat ttatctatgg
4321 gctgtatgaa aagggtggga atgtccactg gaaagaaggg acaccacgg gccctggggc
4381 taggtctgtc ccgagggcac cgcagtctcc cggcgcaggt tcttgtaac ctctcttcc
4441 taggtcctgc acccagacct cagcagcac ctctgcctc tccgctgctt ttggaaagtc
4501 agaaaaagaa gatgtctgct tcgagggcag gaaccccatc catgcagtag aggcgctggg
4561 cagagagtca agcccagca gccatcgacc atggatggtt tctccaagg aaaccgggtg
4621 ggttgggctg gggagggggc acctacctag gaatagccac ggggtagagc tacagtatt
4681 aagaggaaag caagggcgcg gttgctcacg cctgtaatcc cagcactttg ggacaccgag
4741 gtgggcagat cacttcaggt caggagtttg agaccagcct ggccaactta gtgaaacccc
4801 atcttacta aaaatgcaaa aattatccag gcatggtggc acacgcctgt aatcccagct
4861 ccacaggagg ctgaggcaga atcccttgaa gctgggaggc ggaggttgca gtgagccgag
4921 attgcgcat tgcaactccag cctgggcaac agagaaaaaca aaaaggaaaa caaatgatga
4981 aggtctgcag aaactgaaac ccagacatgt gctgccccc tctatgtggg catggttttg
5041 ccagtgttcc taagtgcagg agaacatgtc acctgaggct agttttgcat tcaggctcct
5101 ggcttcggtt cttgttggtg tgctcccca gatcgtcctt cctgtatcca tgtgaccaga
5161 ctgtatttgt tgggactgtc gcagatcttg gcttcttaca gttcttctg tccaaactcc
5221 atcctgtccc tcaggaacgg ggggaaaatt ctccgaatgt ttttggtttt ttggctgctt
5281 ggaatttact tctgccacct gctggtcac cactgctcct ctaagtggat tctggctccc
5341 ccgtacctca tggctcaaac taccactcct cagtgcctat attaaagctt atattttgct
5401 ggattactgc taaatacaaa agaaagtcca atatgttttc atttctgtag ggaaaatggg
5461 attgtgctt taaatctctg agctagggat tttttggcag ctgcagtgtt ggcgactatt
5521 gtaaaattct ctttgtttct ctctgtaaat agcacctgct aacattacaa tttgtattta
5581 tgtttaaaga aggcacatt tgggaacag aactaggaaa tgaattttta gctcttaaaa
5641 gcatttgctt tgagaccgca caggagtgtc tttccttgta aaacagtgat gataatttct
5701 gccttgccc taccttgaag caatgttggt tgaagggatg aagaatctaa aagtcttcat
5761 aagtccttgg gagaggtgct agaaaaatat aaggcactat cataattaca gtgatgtcct
5821 tgctgttact actcaaatca cccacaaatt tccccaaaga ctgcgctagc tgtcaataa
5881 aagacagtga aattgacctg aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Figura 7. Secuencia del gen FGFR-1, se resaltaN los sitios de unión de los oligonucleotidos.

SECUENCIA DEL GEN HPRT.

```

1   ggcggggcct gcttctcctc agcttcaggc ggctgcgacg agccctcagg cgaacctctc
61  ggctttcccg cgcggcgccg cctcttgctg cgctcccgcc tctcctctg ctccgccacc
121 ggcttctccc tcttgagcag tcagcccgcg cgcggcgccg ctccggtatg gcgacccgca
181 gccctggcgt cgtgattagt gatgatgaac caggttatga ccttgattta ttttgcatac
241 ctaatcatta tgctgaggat ttggaaaggg tgtttattcc tcatggacta attatggaca
301 ggactgaacg tcttgctcga gatgtgatga aggagatggg aggccatcac attgtagccc
361 tctgtgtgct caaggggggc tataaattct ttgctgacct gctggattac atcaaagcac
421 tgaatagaaa tagtgataga tccattccta tgactgtaga ttttatcaga ctgaagagct
481 attgtaatga ccagtcaaca ggggacataa aagtaattgg tggagatgat ctctcaactt
541 taactggaaa gaatgtcttg attgtggaag atataattga cactggcaaa acaatgcaga
601 ctttgctttc cttggtcagg cagtataatc caaagatggt caaggtcgca agcttgctgg
661 tgaaaaggac cccacgaagt gttggatata agccagactt tgttgattt gaaattccag
721 acaagtttgt tgtaggatat gcccttgact ataatgaata cttcagggat ttgaatcatg
781 tttgtgtcat tagtgaaact ggaaaagcaa aatacaaagc ctaagatgag agttcaagtt
841 gagtttgaa acatctggag tcctattgac atcgccagta aaattatcaa tgttctagtt
901 ctgtggccat ctgcttagta gagctttttg catgtatcct ctaagaatth tatctgtttt
961 gtactttaga aatgtcagtt gctgcattcc taaactgttt atttgacta tgagcctata
1021 gactatcagt tcctttggg cggattgttg tttacttgtt aaatgaaaaa attctcttaa
1081 accacagcac tattgagtga aacattgaac tcatatctgt aagaaataaa gagaagatag
1141 attagttttt taattggtat tttaatTTTT atatatgcag gaaagaatag aagtgattga
1201 atattgttaa ttataccacc gtgtgttaga aaagtaagaa gcagtcaatt ttcacatcaa
1261 agacagcatc taagaagttt tgttctgtcc tggattatt ttagtagtgt ttcagtaatg
1321 ttgactgtat tttccaactt gttcaaatTA ttaccagtga atctttgtca gcagttccct
1381 tttaaatgca aatcaataaa ttcccaaaaa tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

Figura 8. Secuencia del gen HPRT, se resaltan los sitios de unión de los oligonucleótidos.

Dentro de los resultados obtenidos en cuanto a PCR en tiempo final encontramos que en ambas líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, presentaban amplificación de FGFR-1, mediante la visualización de un producto de 100 pb, el cual es un poco más intenso en la línea celular MDA-MB-231, que es una línea celular mas invasiva, además de que carece de receptor de estrógeno, motivo por el cual la célula posiblemente desarrolla mecanismos alternos de crecimiento, como pueden ser los factores de crecimiento (figura 13).

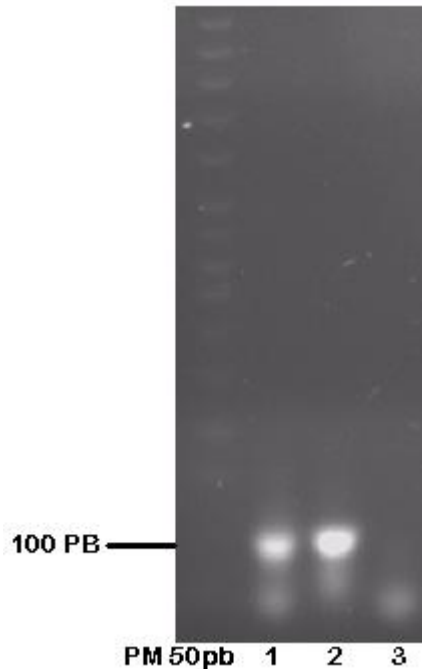


Figura 9. Productos de PCR del gen FGFR1 y 3 con cDNA de células MCF-7 y MDA-MB-231. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, cargando 5 microlitos de la reacción de amplificación: 1) FGFR1 MCF-7, 2) FGFR1 MDA-MB-231, 3) FGFR1 control negativo. Se aprecia la amplificación para FGFR1 el producto es de 100 pb.

En todas las muestras de tumores se obtuvo amplificación para FGFR-1, mediante la observación de una banda de 100 pb correspondiente al fragmento que amplifican los oligonucleotidos específicos, por lo general la intensidad de las bandas entre las diferentes muestras de tumor por PCR Tiempo Final, fueron similares, excepto para las muestras M7 y M17, en las que la intensidad fue menor.. En el caso de las muestras de tejido sano se observó amplificación de FGFR-1, sin embargo la intensidad de la banda de 100 pb fue menor en estas muestras respecto a las de tumor, infiriendo que existe una menor expresión de FGFR-1 en dichos tejidos (figuras 14 y 15).

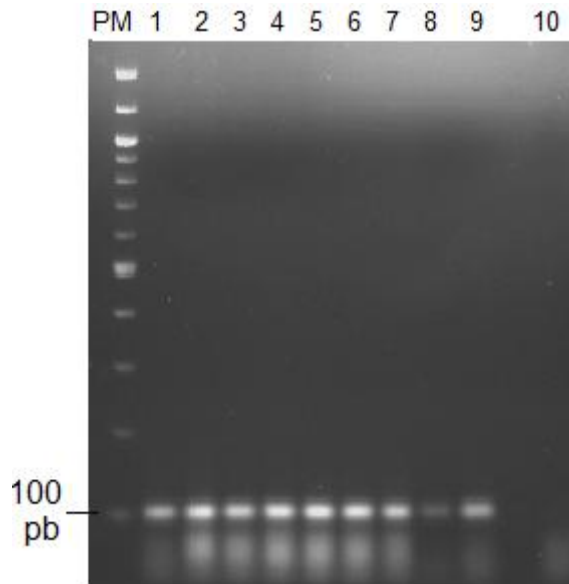


Figura 10. Productos de PCR del gen FGFR-1 utilizando cDNA de tumores y tejido sano, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, se cargaron 5 microlitos de la reacción de amplificación. Los carriles corresponden a: PM 100 pb; 1, M7; 2, M12; 3, M17; 4, M18; 5, M19; 6, M81; 7, M83; 8, S2I; 9, S3I; 10, control negativo.

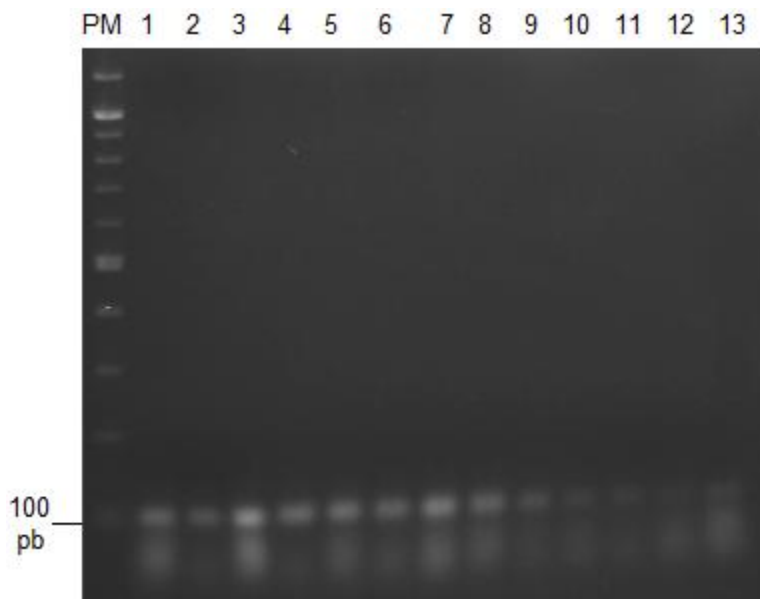


Figura 11. Productos de PCR del gen FGFR-1 utilizando cDNA de tumores y tejido sano. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio se cargaron 5 microlitos de la reacción de amplificación. Los carriles corresponden a PM, 100 pb; 1, M5; 2, M6; 3, M7; 4, M8; 5, M9; 6, M84; 7, M88; 8, MS2I; 9, S3I; 10, S4I; 11, S5I; 12, S6I; 13, Ctrl negativo.

Con respecto a la expresión del gen constitutivo HPRT por PCR en Tiempo Final se pudo observar cierta heterogeneidad en la intensidad de una banda de 100 pb, correspondiente al producto delimitado por los oligonucleótidos para este gen, lo que puede deberse a variabilidad entre las muestras o en el proceso de RT-PCR, en el primer caso puede haber cambios en la proporción entre los diferentes mensajeros, en el segundo variaciones en la reacción de la transcriptasa reversa y/o la amplificación, esto debido a que la normalización de la cantidad de RNA se realizó empleando 1 μ g de RNA del extracto de RNA total, como punto de partida del RT-PCR, (Figura 16). La intensidad de las bandas correspondientes a los tejidos sanos fue comparable a la de los tumores que presentaban menor intensidad en la misma.

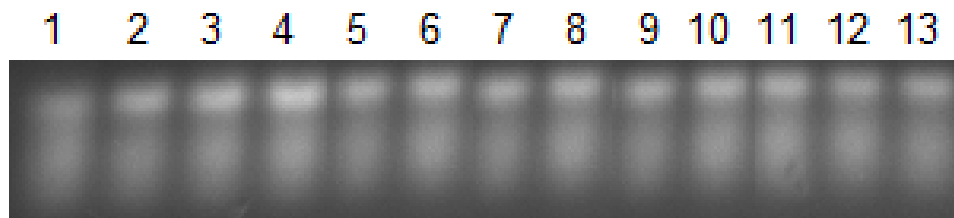


Figura 12. Productos de PCR del gen HPRT utilizando cDNA de tumores y tejido sano. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, cargando 5 microlitros del producto de la reacción de PCR. Los carriles 1 a 11 corresponden a las muestras de tumores M3, M5, M9, M17, M18, M19, M81, M83, M84, M88, M89 sucesivamente; carriles 12 y 13 tejido sano S4 y S6.

PCR TIEMPO REAL

Después de observar la amplificación por PCR Tiempo Final se procedió a la estandarización del PCR Tiempo Real, modificando la concentración de magnesio para los genes FGFR-1 y HPRT utilizando cDNA de MCF-7, ya que al realizar el PCR en Tiempo Real con las mismas condiciones que el PCR Tiempo Final no había amplificación. Se realizó un gradiente de magnesio utilizando concentraciones de 2, 3, 4, 5 y 6 mM. Se encontró que la concentración óptima de magnesio con la cual había una mejor amplificación era 6 mM (figura 17).

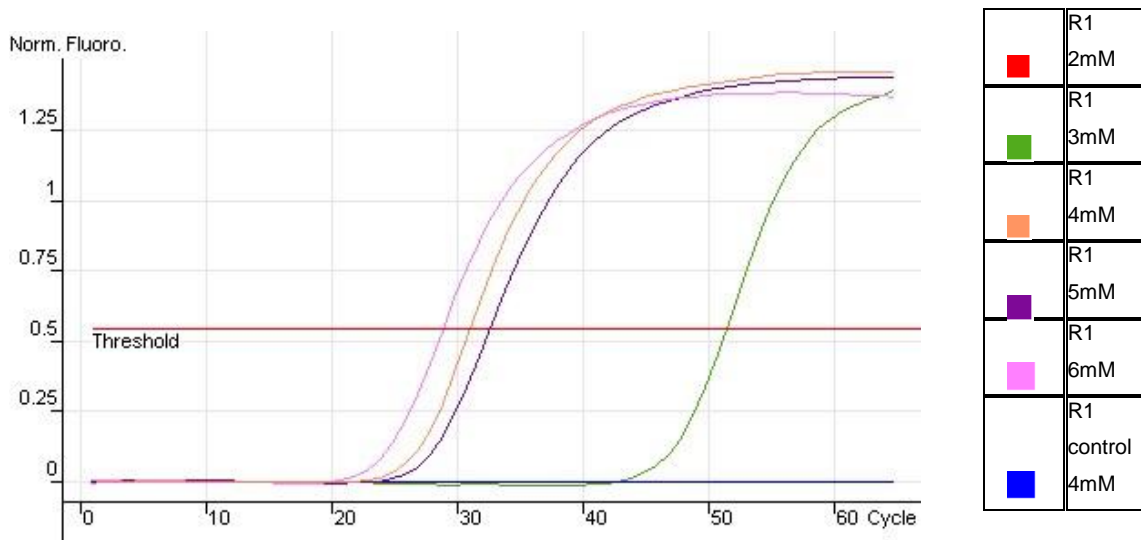


Figura 13. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de la línea celular MCF-7, se realizó un gradiente de magnesio para estandarizar su concentración óptima, se encontró que ésta es de 6 mM. En el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el Y los niveles de fluorescencia; la línea roja indica el nivel del umbral (“threshold”).

Para el caso del PCR en Tiempo Real utilizando cDNA de células, se corroboró lo apreciado en los ensayos de PCR Tiempo Final, la línea celular MDA-MB-231 presentaba una mayor amplificación con respecto a MCF-7 (figura 18).

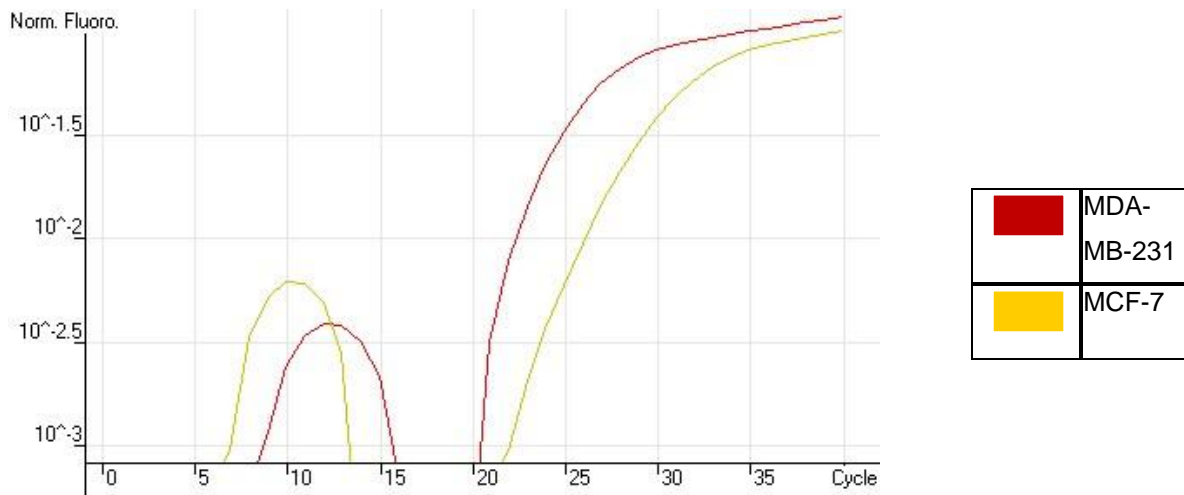


Figura 14. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, en el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el Y los niveles de fluorescencia.

Posteriormente se realizó el análisis de curva de fusión para identificar si existen estructuras secundarias o bien que los oligonucleótidos se estuvieran alineando en sitios inespecíficos, en la figura 19 se observa la curva señalada para el gen FGFR-1, en donde podemos ver exclusivamente dos picos de fluorescencia correspondientes a FGFR-1, uno más bajo que otro debido a que hay diferente grado de amplificación de este gen en FGFR-1 con estos resultados pudimos verificar, que efectivamente, bajo esas condiciones se está amplificando el fragmento del gen con el tamaño esperado, y que había un buen acoplamiento de los oligonucleótidos.

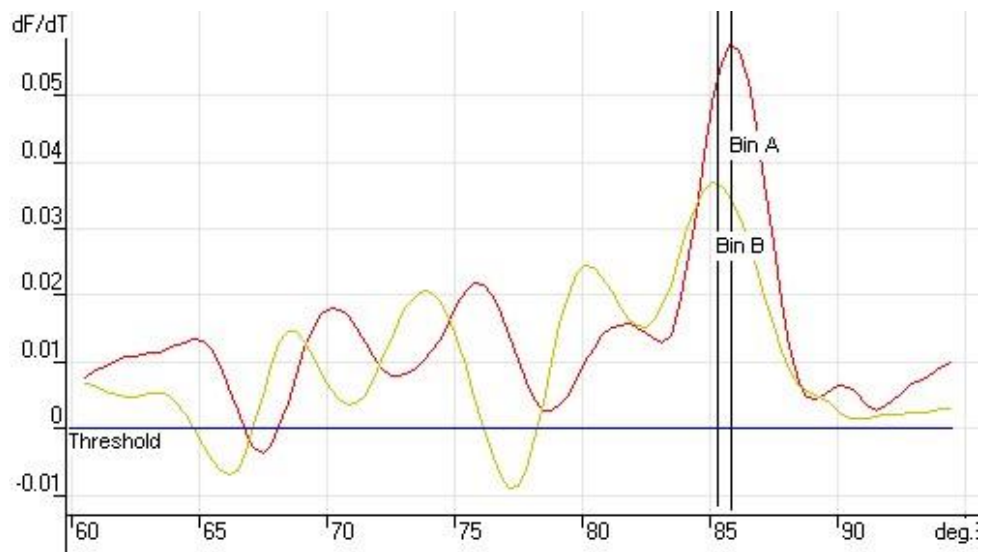


Figura 15. Curva de fusión para identificar que los oligonucleótidos para FGFR-1 no forman estructuras secundarias, la curva mas alta corresponde a MDA-MB-231 y la baja a MCF-7. Se observa efectivamente, que solo se tiene un producto amplificado y que existe mayor amplificación por la línea celular MDA-MB-231.

Una vez estandarizadas las condiciones de magnesio se procedió a realizar el PCR en tiempo real para las muestras de tumores y de tejidos sanos, éstas se dividieron en 2 experimentos, debido que la cantidad de muestras por duplicado no cabía en el rotor del termociclador. En un experimento se colocaron las muestras: M3, M5, M7, M9, M11, M16, M17, para FGFR-1 y HPRT, con los tejidos sanos S2, S3 y S4, en los cuales es posible observar una menor amplificación (Figura 20).

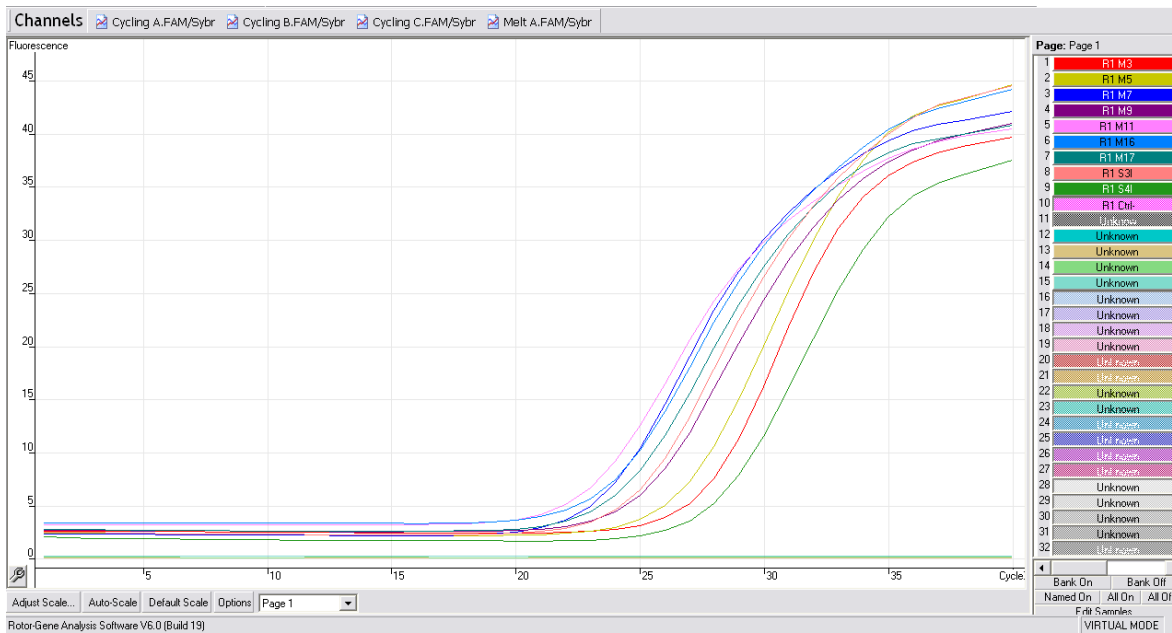


Figura 16. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de los tejidos tumorales M3, M5, M7, M9, M11, M16, M17 y sanos S2, S3 y S4, en el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el eje Y los niveles de fluorescencia.

Al realizar el análisis de la curva de fusión para estas muestras se pudo observar la especificidad en la amplificación para el receptor FGFR-1, la formación de dímeros, así como la amplificación inespecífica es mínima (Figura 21).

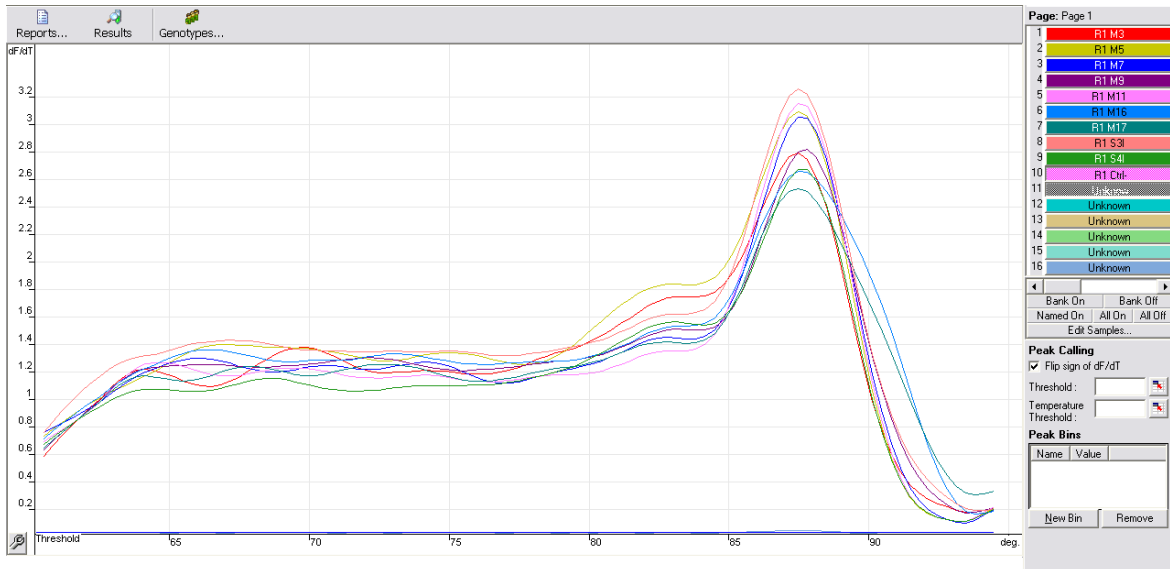


Figura 17. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen FGFR-1. Se puede observar que solo se tiene un producto amplificado y la formación de dímeros o estructuras secundarias es mínima.

En el otro experimento, se analizaron las muestras M18, M19, M81, M83, M84, M87, M88 y M89, y los tejidos sanos S5 y S6, de igual manera para los genes HPRT y FGFR-1. En la figura 22 se puede apreciar una menor amplificación en las muestras de los tejidos sanos S5 y S6, evidenciando una mayor expresión en los tumores mamarios.

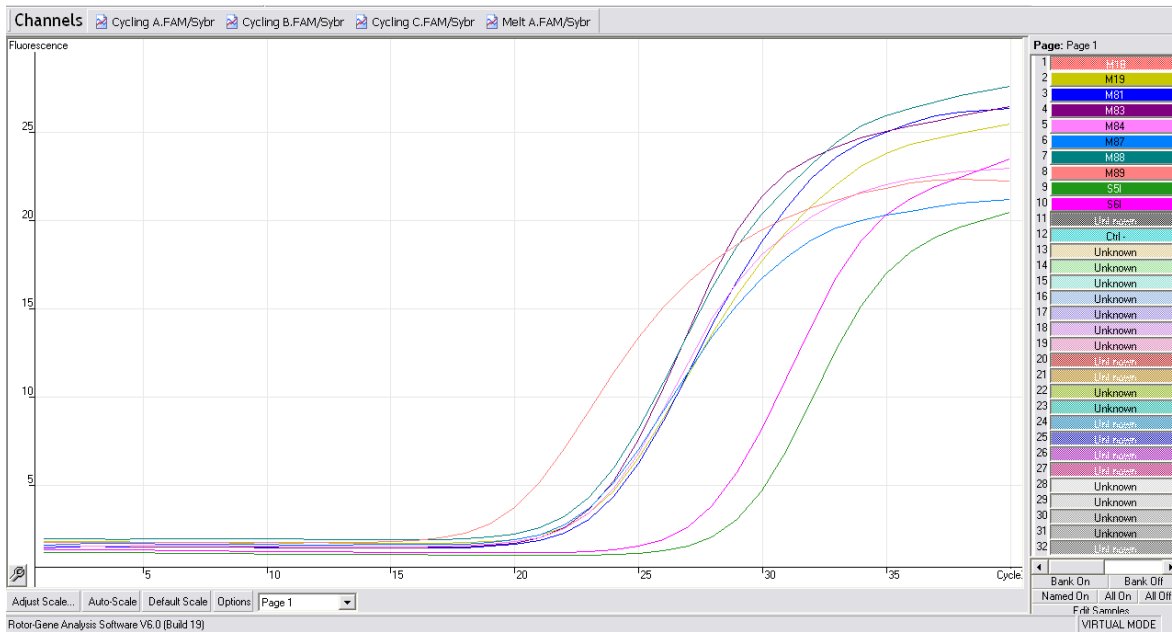


Figura 18. Curva de amplificación del gen FGFR-1 utilizando cDNA de los tejidos tumorales M18, M19, M81, M83, M84, M87, M88 y M89, y los tejidos sanos S5 y S6, en el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el Y los niveles de fluorescencia.

Al hacer el análisis de la curva de fusión para las muestras de este experimento podemos observar también que la especificidad en la amplificación para el receptor FGFR-1 es alta, y la formación de dímeros, así como la amplificación inespecífica es mínima (figura 23).

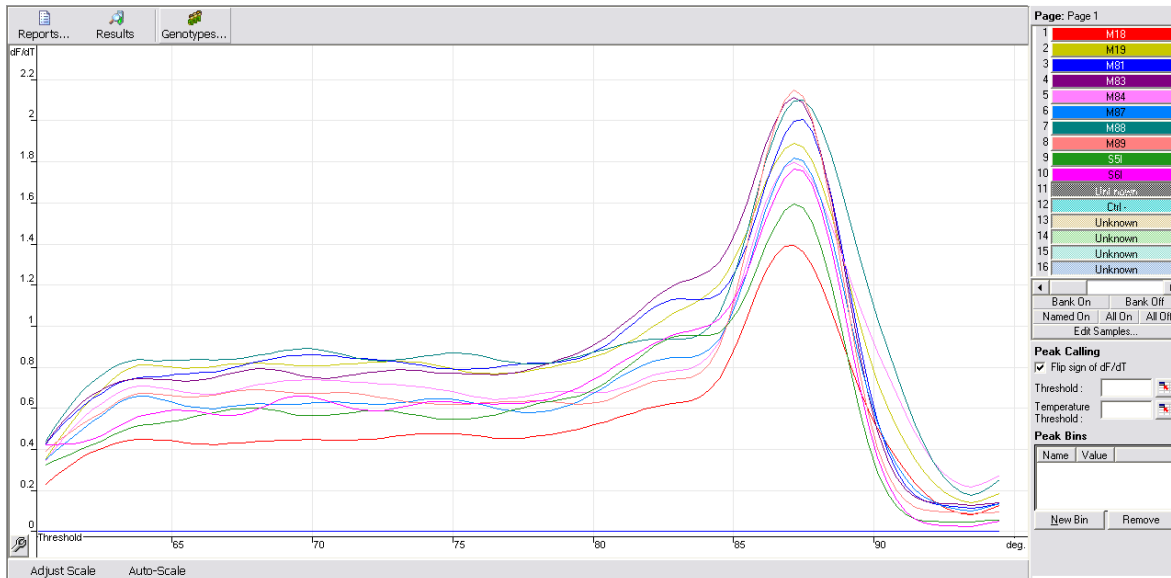


Figura 19. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen FGFR-1. Se puede observar que solo se tiene un producto amplificado y la formación de dímeros o estructuras secundarias es mínima.

En el caso de la amplificación del gen HPRT fue más homogénea en todas las muestras, como se puede observar en la figura 24, lo que nos indica el buen estado de las muestras usadas, al realizar el análisis de la curva de fusión observamos la especificidad de los oligos para HPRT a pesar de una ligera formación de estructuras secundarias al comienzo de la amplificación (figura 25).

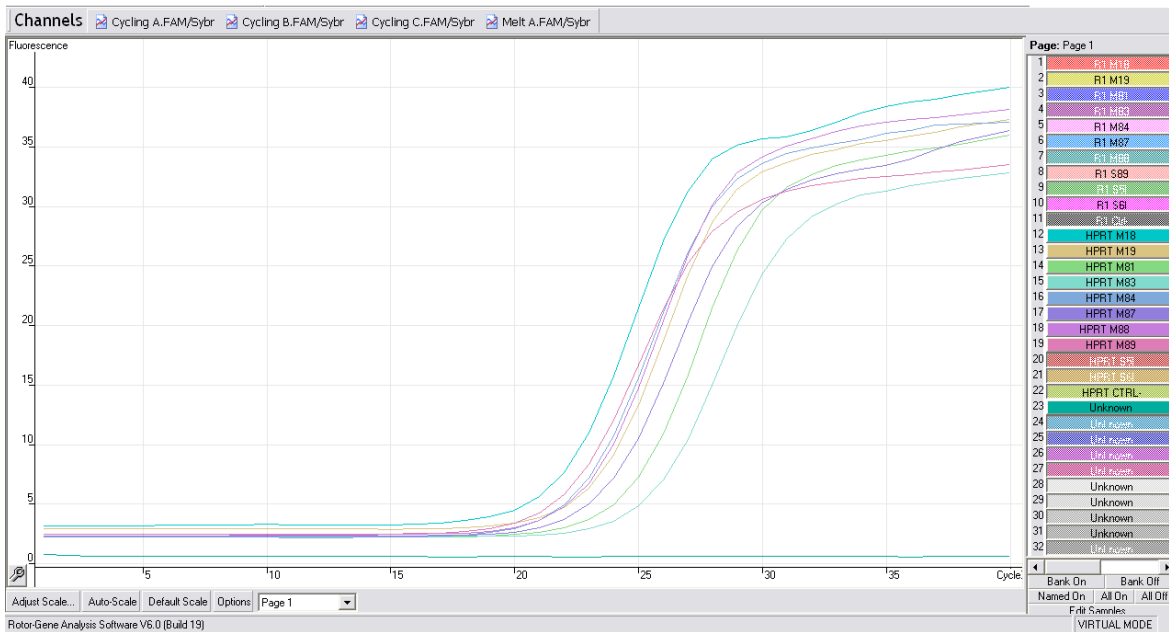


Figura 20. Curva de amplificación del gen HPRT utilizando cDNA de los tejidos tumorales y tejidos sanos, en el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el eje Y se muestran los niveles de fluorescencia.

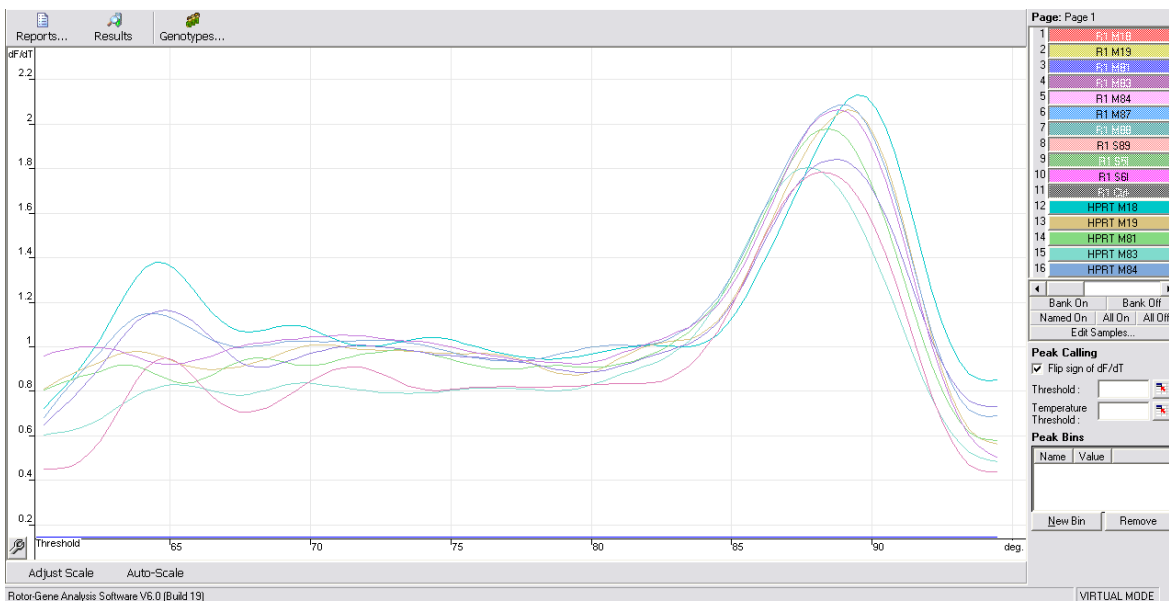


Figura 21. Curva de fusión para visualizar la adecuada amplificación del gen HPRT. Se puede observar que solo se tiene un producto amplificado y la formación de dímeros o estructuras secundarias es mínima al inicio del experimento.

Se realizó un análisis comparativo de ciclo umbral (Ct), el cual calcula los niveles relativos de expresión en comparación con un calibrador o control, en este caso el gen HPRT. Y se registran las veces de cambio con respecto al gen de referencia o casero ("housekeeping"). En la figura 26 podemos observar los resultados del análisis comparativo de Ct, en el cual se aprecia un mayor cambio en la expresión de FGFR-1 en los tumores, los cuales abarcan las 15 primeras columnas respecto a los tejidos sanos, ejemplificados en las 5 últimas columnas. La mayor expresión se obtuvo en la muestra M5 correspondiente a un carcinoma lobulillar infiltrante de un paciente de 67 años, estadio EC IIB, con 90% de expresión de receptor de estrógenos y 90% de progesterona, negativo para HER-2 y fue aproximadamente ocho veces mas que los tejidos sanos. El segundo tumor con alta expresión corresponde a la muestra M83 y se trató de un carcinoma ductal infiltrante en paciente de 42 años EC IIA con 40% de expresión de receptor de estrógenos y 30% de progesterona, negativo para HER-2, en este caso la expresión fue 5 veces mayor que en los tejidos sanos.

El tercer tumor con mas expresión de FGFR-1 fue la muestra M3 que es un carcinoma ductal infiltrante estadio IIIB en paciente de 78 años, negativo para los tres receptores y fue aproximadamente 5 veces mas que los tejidos sanos. Los siguientes tumores con mayor expresión corresponden a las muestras M9 carcinoma ductal infiltrante, estadio IIIB en paciente de 42 años, negativo para los tres receptores; y M17 carcinoma ductal infiltrante en paciente de 66 años EC IIA, negativo para los tres receptores.

En la Figura 27 se aprecia el análisis de Delta Delta Ct el cual expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct control que en este caso fue el promedio de los tejidos sanos, para ejemplificar las veces de cambio de las muestras de tumor en relación a las de los tejidos sanos.

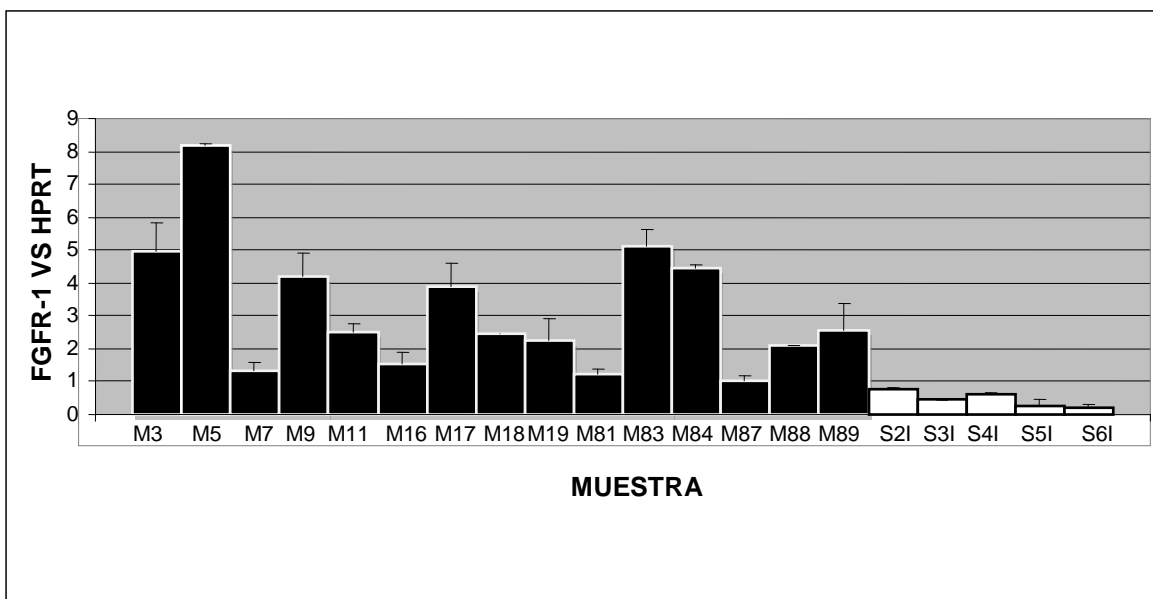


Figura 22. Amplificación de FGFR-1 en tumores mamarios. Análisis comparativo de Delta Ct. Se presenta la media y la desviación estándar de tres repeticiones para cada muestra. Cuando se compararon los tejidos sanos con los tumorales por la prueba de t de Student se encontraron significativamente diferentes con un $P < 0.05$. Las barras en negro corresponden a las muestras de tumores y las de color blanco a las de los tejidos sanos.

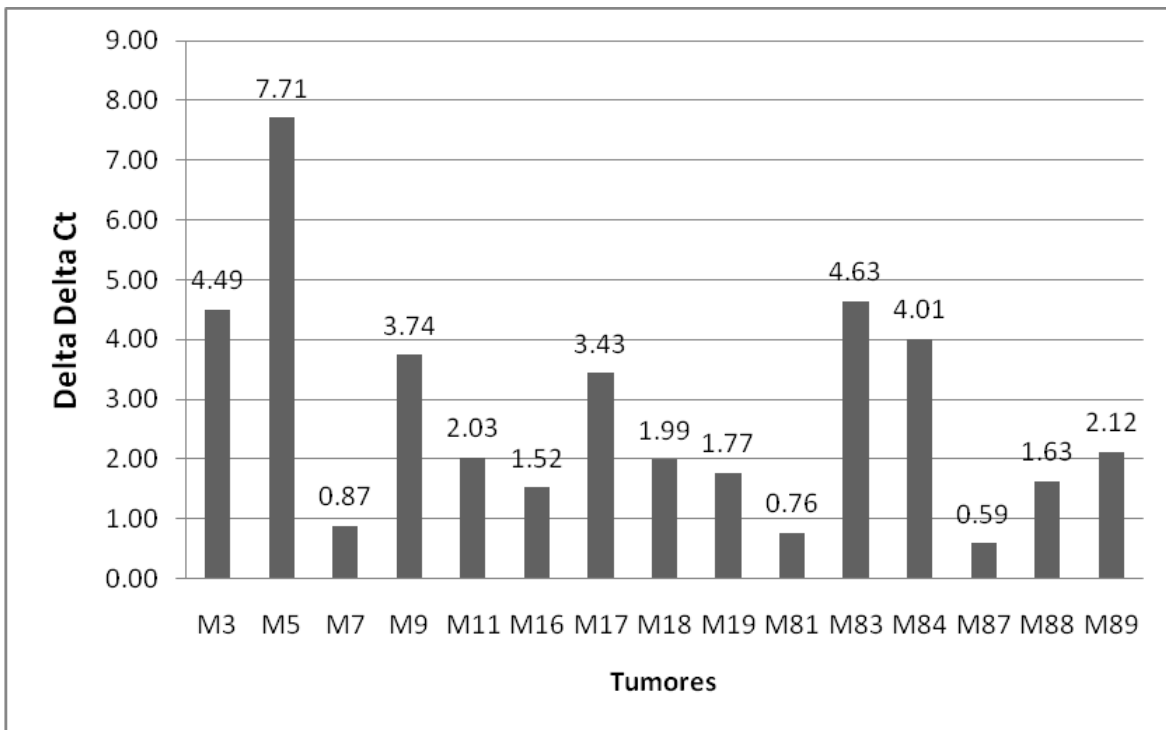


Figura 23. Amplificación de FGFR-1 en tumores mamarios. Análisis por el método Delta Delta Ct.

DISCUSION

Las líneas celulares son valiosos modelos a la hora de analizar ciertos aspectos de la biología celular del cáncer de mama. Sin embargo, son células transformadas aisladas creciendo en un frasco de cultivo, además de estar sometidas a estímulos distintos a los de células in vivo y esto debe ser tomado en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados y al extraer conclusiones. Carecen, entre otros factores, de una verdadera interacción epitelio, estroma y matriz, estructura tisular, respuesta inmune del huésped, exposición a hormonas y a factores ambientales, etc., consecuentemente, pueden diferir del tumor que les dio origen. No obstante, la homogeneidad, reproducibilidad y manipulación de las condiciones de cultivo hacen de las líneas celulares buenas herramientas de investigación.

Las líneas celulares fueron de gran utilidad para la estandarización de la metodología de la PCR y para darnos una idea de cómo es la expresión de FGFR-1, por una parte la línea MCF-7 se utiliza como control positivo de patología hormono-dependiente, cuenta con receptor de estrógenos; y la línea MDA-MB-231 con características más invasivas, no posee receptores de estrógenos, se utiliza como modelo de independencia hormonal. La expresión de FGFR-1 fue mayor en la línea celular MDA-MB-231 respecto a MCF-7, tanto en los experimentos de RT-PCR en tiempo final con la presencia de una banda de 100 pb más intensa, como en tiempo real con un Ct más bajo, indicativo de rápida amplificación. Lo anterior nos indica que este receptor se asocia con fenotipos invasivos, y en este caso, donde no está presente el receptor de estrógenos, estos resultados concuerdan con lo encontrado en los tumores, en los cuales hubo mayor expresión en las muestras que eran negativas para receptor de estrógenos, progesterona y HER2. Lo anterior puede ser indicativo de que el tumor desarrolla nuevos mecanismos para continuar con su crecimiento, si no tiene receptores para dichas hormonas y factores de crecimiento, en este caso los FGF pueden ser la fuente de crecimiento de las células tumorales.

El reto del tratamiento del cáncer ha sido encontrar alternativas específicas para distintos tipos de tumores, para maximizar la eficacia y minimizar la toxicidad. Mejoras en la clasificación del cáncer han sido fundamentales para los avances en su tratamiento. La clasificación del cáncer se ha basado principalmente en la morfología, apariencia del tumor, pero esto tiene serias limitaciones. Los tumores con apariencia histopatológica similar pueden seguir de manera significativa diferentes cursos clínicos y mostrar diferentes respuestas a la terapia.²⁵

La resistencia a antiestrógenos es uno de los principales retos en el tratamiento del cáncer de mama. Durante más de 25 años, el estándar para el tratamiento endocrino de todas las etapas de cánceres de mama positivos al receptor de estrógeno (RE) ha sido el tamoxifeno. Sin embargo, en la configuración avanzada, aproximadamente la mitad de los pacientes con tumores de mama RE positivos no responde al tratamiento endocrino, mientras que las tasas de respuesta en pacientes que con tumores primarios RE negativos son bajas. Por lo tanto, se requieren biomarcadores adicionales que puedan identificar a los pacientes que no responderán y que puedan seleccionar a los pacientes para diversos tratamientos a la medida.²⁶

Existen pocos informes que correlacionan la sub clasificación genómica, con características clínicas. Calza y Cols.²⁷ han informado de la correlación entre la clasificación molecular y las características clínicas de una serie de 412 pacientes con cáncer de mama. Se informó de un alto nivel de correlación entre la subclasificación molecular, la edad, la expresión de RE, el grado tumoral y la mutación de p53. En este estudio, los tumores fueron más de tipo RE negativo, alto grado, y mostraron una mutación de p53 en 65% de los pacientes. Además, estos tumores ocurrieron en mujeres jóvenes en comparación con otras sub-clases.

Mediante estudios basados en genómica, varios equipos han propuesto para identificar las subclases moleculares herramientas convencionales de diagnóstico.

Las subclases moleculares se han definido por primera vez de acuerdo con la expresión de RE, RP y HER2 por inmunohistoquímica (IHC) ^{28,29}. Los tumores del grupo HER2, que expresa altos niveles del gen HER2 y tumores HER2 + / RE-, (negativos al receptor de estrógenos) muestran una mejor respuesta a la quimioterapia y cerca de 50% responde al tratamiento con Trastuzumab. El grupo “parecido al normal” se caracteriza por expresar un gran número de genes propios del epitelio mamario normal (negativos al receptor de estrógenos). El grupo “basal” expresa genes característicos de las células basales de la mama, en particular queratinas 5 y 17, y son negativos al receptor de estrógenos y HER 2, otro grupo fue denominados “triple negativo” (TN), es decir negativo para RE, RP y HER-2 (RE-/RP-/HER2-).

El grupo “luminal” se distingue por la expresión, relativamente alta, de muchos genes expresados en las células epiteliales de la luz de los conductos mamarios, incluido el receptor de estrógenos. Son tumores negativos a HER2 y suelen tener la mejor tasa de supervivencia. Varias otras características han sido investigadas de acuerdo a la clasificación molecular. Los pacientes que presentan un subtipo basal son más jóvenes. Además, el grado tumoral y el recuento de mitosis es mayor en el grupo basal comparado con tumores del grupo luminal.³⁰

En previos estudios, la amplificación de FGFR-1 corresponde aproximadamente entre 8% y 15% de los casos de tumores y se asocia con la presencia de receptor de estrógenos, la amplificación 11p12 y una edad mayor a 50 años.^{31, 32}. En el caso de los resultados de RT-PCR y RT PCR en Tiempo Real encontramos una gran heterogeneidad en la expresión de FGFR-1 en los tumores por estadio. La mayor expresión se dio en la muestra 5 de carcinoma lobulillar infiltrante EC IIB en paciente de 67 años, lo que concuerda con lo descrito por Reis-Filho³² y colaboradores, quienes encuentran amplificación de FGFR-1 en carcinomas lobulillares, cuya característica es que son negativos para HER-2 y positivos para RE y RP, y en pacientes mayores de 50 años. Sin embargo no todos los tumores concuerdan con este tipo histológico.

El segundo tumor con mas expresión muestra 83, se trato de una carcinoma ductal infiltrante EC IIA negativo para HER-2 y con un 40% de RE y 30% de RP en paciente de 42 años, en este caso a diferencia del anterior, se tiene que la paciente es menor de 50 años, es otro tipo histológico y la presencia de RE y RP es menos de la mitad que el caso anterior, no obstante, se ha reportado la presencia de FGFR-1 en tejido mamario sano de los tipos epitelial ductal y lobulillar , así como en tumores³³, por lo que la expresión de FGFR-1 se da en ambos tipos histológicos.

En este caso se puede identificar a un grupo de 3 tumores similares, las muestras 3, 7 y 9, que se trataron de carcinomas ductales infiltrantes EC IIIB triples negativos, para HER2, RE y RP en pacientes de 78, 42 y 54 años respectivamente, casos con características diferentes a las muestras anteriores, los cuales concuerdan con estudios en los que se ha encontrado niveles significativamente mayores de FGFR-1 en tumores RE negativos comparados con tumores RE positivos.³⁴ Entre los subgrupos de cáncer de mama, el triple negativo es especialmente temido porque es asociado con características clínico-patológicas más agresivas y un mal pronóstico. Los pacientes con tumores TN tienen una mayor probabilidad de recidiva a distancia y de muerte en comparación con las mujeres con otros tipos de cáncer, tienen tumores relativamente grandes (mayores de 2 cm), una alta tasa de nodos positivos (54%) y se presentan en mujeres jóvenes.³⁵ Otras muestras TN, fueron la 17 y la 18, nada más que en una etapa tumoral menos avanzada, IIA y IIB, de 66 y 52 años respectivamente. La muestra 87 concuerda con el estadio IIIB y una edad corta para el estadio tan avanzado 42 años, sin embargo la expresión de FGFR-1 en esta muestra es relativamente baja en comparación a las otras.

El cuarto tipo que registro una expresión elevada de FGFR-1, muestra 84 también presenta diferencias con los casos anteriores, se trato de una carcinoma ductal infiltrante EC IIB negativo para HER-2 y con 90% de RE y 90% de RP en paciente

de 40 años, en este caso la diferencia. Con características histológicas similares a este tumor encontramos a las muestras 16, 19 y 88, aunque con menor expresión de FGFR-1.

La activación de distintos receptores de factores de crecimiento conduce a la iniciación de vías que impactan múltiples funciones de la célula. Por ejemplo, la activación de c-Met, promueve fuertemente la migración, pero también puede incrementar la proliferación, la supervivencia, y la angiogénesis. Así, la activación de varios receptores de factor de crecimiento puede favorecer la progresión del tumor mediante la activación y solapamiento de vías de transducción de señal.
36,37

La redundancia en estas vías probablemente existe debido a la importancia fundamental de los procesos biológicos que regulan la supervivencia y crecimiento celular. La activación alternativa de receptores de tirosina cinasa en las células tumorales puede anular el efecto de los inhibidores de la familia EGFR, así como de los inhibidores del RE.^{38,39} En este caso una de las hipótesis es que la familia de receptores de factor de crecimiento fibroblástico pueden ser algunos de estos receptores de tirosina cinasa, y el FGFR-1 como se ha mostrado en los resultados, es un potencial candidato.

Mediante la combinación de terapias que bloqueen múltiples vías de señalización intracelular y de la superficie celular, la señalización de los receptores redundante podría ser bloqueada y un mayor beneficio clínico se podría alcanzar. Por lo tanto, identificando las principales moléculas de señalización río abajo en el que las señales del receptor del factor de crecimiento convergen puede ser importante en el desarrollo de agentes terapéuticos que bloqueen las señales de múltiples receptores de factor de crecimiento. Con respecto a FGFR-1 se ha demostrado que su bloqueo por medio de un compuesto de bajo peso molecular reduce la proliferación de células de cáncer de mama⁴⁰. El bloqueo de FGFR-1 en células

MDA-MB-134, las cuales sobreexpresan a este receptor y son RE positivas, resulta en una disminución de la viabilidad ³².

Los recientes avances en la comprensión de la señalización por RE han revelado una compleja red de interacciones en las vías de señalización con factores de crecimiento. Usar solo al RE como una vía aislada puede no ser una estrategia óptima y la inhibición simultánea de otros elementos activos de la señalización que interactúan con el RE puede ser necesaria para mejorar la respuesta endocrina y prevenir la resistencia.⁴¹

El uso de marcadores como el receptor de estrógeno y HER2 para la selección del tratamiento está bien establecida, sin embargo, aun con estos marcadores, las deficiencias en las metodologías todavía pueden afectar su aplicación. El reciente interés en la terapia personalizada ha llevado al uso extendido de estos y otros marcadores conocidos como receptor de progesterona y Ki67 y de una plétora de nuevos marcadores individuales y perfiles de múltiples genes que están buscando establecimiento. La validación final de estos y otros marcadores recientes y futuros desarrollados como resultado de la marcada tecnología avanzada, se requiere antes de su aplicación clínica. EL FGFR-1 es un potencial marcador y blanco terapéutico para algunos subtipos de cáncer de mama.⁴²

Es probable que un enfoque combinado para medir simultáneamente múltiples marcadores serían más exitosas en la detección de cáncer de mama temprano. Lo ideal sería que un panel de biomarcadores debe ser capaz de detectar el cáncer de mama en pacientes asintomáticos, y mejorar la precisión de las mamografías. Un biomarcador confiable también puede mejorar el pronóstico y diagnóstico y posible blanco para el cáncer de mama.

CONCLUSIONES

- La línea celular MDA-MB-231 tiene mayor expresión de FGFR-1 respecto a la línea celular MCF-7.
- Existe una mayor expresión de FGFR-1 por parte de los tumores respecto a los tejidos sanos.
- La sobre expresión de FGFR-1 en nuestro estudio se da en tumores que son HER-2 negativos.
- La expresión de FGFR-1 no depende de la etapa del tumor.

BIBLIOGRAFIA

1. SUIVE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. DGE-SSA. Morbilidad y Mortalidad 2001. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.html>]
2. Knaul, F., Lozano, R., Gómez Dantés, H. y Arreola-Ornelas. 2008. “El cáncer de mama en México: cifras para la toma de decisiones”. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud.
3. Arraztoa, J. 2004. La mama diagnóstico y tratamiento. 2da ed. Ed. Mediterraneo. Santiago, Chile.
4. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D y Darnell JE. 2002. Biología celular y molecular, 4ª Ed., Ed. Médica Panamericana.
5. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. 1996. Biología Molecular de la Célula. 3ª ed., Omega, Barcelona.
6. Rosen, P.P. 1979. The pathological classification of human mammary carcinoma: past,present and future. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 9:144-156.
7. Henderson, I.C. y Patek, A.J. 1998. The relationship between prognostic and predictive factor in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 52: 261-268.
8. National Cancer Institute (2009) Breast Cancer <http://www.cancernet.nci.nih.gov/index.html>
9. Aaronson, S. A. 1991. Growth Factors and Cancer. *Science*. 254(5035):1146-1153.
10. Hynes, N. 2000. Tyrosine kinase signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2:154–157.
11. Newby, J.C., Johnston, S.R., Smith, I. E. y Dowsett, M. 1997. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin. Can. Res.* 3:1643-1651.
12. Smith, C.L. 1998. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* 58(3):627-632.

13. Dickson, C., Spencer-Dene, B., Dillon, C. y Fantl, V. 2000. Tyrosine kinase signaling in breast cancer. Fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res* 2000, **2**:191–196.
14. McIntosh, I., Bellus, G. y Wang Jabs, E. 2000. The pleiotropic effects of fibroblast growth factor receptors in mammalian development. *Cell Struct Funct.* 25:85-96.
15. Ornitz, D. e Itoh, N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2(3):3005.1–3005.
16. Ornitz, D., Xu, J., Colvin, J., McEwen, D., MacArthur, C., Coulier, F., Gao, G. y Goldfarb, M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271:15292-15297.
17. Mohammadi, M., Olsen, K. e Ibrahimmi, O. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cyt. Growth Factor Revs.* 16:107–137.
18. Johnston, C., Cox, H., Gomm, J. y Coombes, C. 1995 Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. *J. Biol. Chem.* 270:30643–30650.
19. Zammit, C., Barnard, R., Gomm, J., Coope, R., Shousha, S., Coombes, C. y Johnston, C. 2001. Altered intracellular localization of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer. *J Pathol.* 194: 27–34.
20. De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J., Hajihosseini, M., Rosewell, I. y Dickson, C. 2000. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal–epithelial signaling during mouse organogenesis. *Development* 127(3):483–92
21. Plowright, E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D., Branch, D., Hawley, R.G y Stewart, K. 2000. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood* 95:992-998.
22. Zhou, L., Somlo, G., Zhou, B., Shao, J., Bedell, V., Slovak, M., Liu, X., Luo, J. y Yen, Y. 2005. Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short

- hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 4(5):787–98.
23. Powers, C.J., McLeskey, S.W. y Wellstein, A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer.* 7:165–197.
24. Tomlinson, D. C., L'Ho[^]te, C. G., Kennedy, W., Pitt, E. y Knowles, M. 2005. Alternative splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits Fibroblast Growth Factor–Induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 65(22):10441-10449.
25. Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M., Downing, R., Caligiuri, M.A., Bloomfeld, C.D. y Lander, E. S. 1999. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 286:531-537.
26. Jansen, M., Foekens, J.A., van Staveren, I.L., Dirkzwager-Kiel, M.M., Ritstier, K., Maxime, P.L., Meijer-van Gelder, M.E., Sieuwerts A.M., Portengen, H., Dorssers, L.C.J, Klijn, J.G.M y Berns, E.M.J.J. 2005. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J. Clin. Oncol.* 23(4):732-740.
27. Calza, S., Hall, P., y Auer, G. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R34.
28. Winer E, Carey LA y Dowsett M. Beyond anatomic staging: are we ready to take the leap to molecular classification?. Educational book, American Society of Clinical Oncology 2005: 46–59.
29. Carey LA, Perou CM, y Livasy CA . 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 295: 2492–2502.
30. Gelsi-Boyer, V., Orsetti, B., Cervera, N., Finetti, P., Sircoulomb, F., Rouge, C., Lasorsa, L., Letessier, A., Ginestier, C. y Monville, F. 2005.

Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. *Mol Cancer Res*, 3:655-667.

31. Luqmani, Y.A., Graham, M. y Coombes, R.C. 1992. Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br. J. Cancer*. 66(2):273-80.
32. Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Turner, N.C., Lambros, M.B., Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Sarrio, D., Savage, K., Dexter, T., Irvani, M., Fenwick, K., Weber, B., Hardisson, D., Schmitt, F.C., Palacios, J., Lakhani, S., y Ashworth, A. 2006. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin. Cancer Res*. 12(22):6652-6662.
33. Morikawa, Y., Ishishara, K., Tohya, K., Kakudo, M., Seo, K. y Matsuura, N. 1996. Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in human normal tissues and tumors determined by a new monoclonal antibody. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 120:490-496.
34. Luqmani, Y.A., Mortimer, C., Yiangou, C., Johnston, C.L., Bansal, G.S., Sinnott, D., Law, M. y Coombes, R.C. 1995. Expression of 2 variant forms of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in human breast. *Int. J. Cancer*. 64:274-279.
35. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W., Kahn, H., Sawka, C., Lickley, L., Rawlinson, E., Sun, P., y Narod, S. 2007. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res*. 13(15):4429-4434.
36. Herynk, M.H., Stoeltzing, O., y Reinmuth, N. 2003. Down-regulation of c-Met inhibits growth in the liver of human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*, 63:2990–2996.
37. Reinmuth, N., Fan, F., y Liu, W. 2002. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest*. 82:1377– 1389.
38. Chakravarti, A., Loeffler, J.S., y Dyson, N.J. 2002. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor

- therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res.* 62:200–207.
39. Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., y Pollak, M. 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst.* 93:1852–1857.
40. Massarweh, S. y Schiff, R. 2006. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocrine -Related Cancer.* 13:S15–S24.
41. Koziczak, M., Holbro, T. y Hynes, N. 2004. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through down regulation of D-type cyclins. *Oncogene.* 23:3501–3508.
42. Dowsett, M. y Dunbier, K. 2008. Emerging biomarkers and new understanding of traditional markers in personalized therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 14(24):8019-8026.