



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Análisis y desarrollo de perfil génico para diferenciar tumores mamarios espontáneos en modelo de ratas Wistar longevas.

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

LUISA ANAHI BERNAL PELÁEZ

ASESOR: DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY

COASESOR: DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Cuando 2 metros de ácidos nucleicos
se encuentran en menos de 10 micras,
¿Qué va a ser imposible?*

Agradecimientos.

Gracias a Dios.

Gracias a mis padres, hermano, y familia.

Gracias a mis profesores, amigos y compañeros.

Gracias a la vida, gracias a la ciencia,
y gracias a toda circunstancia que
aportó su porción de ácidos nucleicos necesarios
para hacerme el organismo que soy ahora.

ÍNDICE

i. Agradecimientos	2
ii. Índice	3
iii. Resumen	5
1. Introducción	6
2. Marco teórico	8
2.1 Importancia del estudio de mama	8
2.2 La mama y alteraciones en modelo experimental murino	8
2.2.1 Rata Wistar y tejido mamario	
2.2.2 Tumores espontáneos en modelo murino	
2.2.2.1 Fibrosarcomas	
2.2.2.2 Carcinomas	
2.2.2.3 Fibroadenomas	
2.2.2.4 Fibroquistes	
2.3 Moléculas asociadas a alteraciones en tejido mamario	13
2.3.1 Hexocinasas	
2.3.2 Canales iónicos	
2.3.3 Unidad ribosomal 18s	
2.4 Métodos de detección de alteraciones en tejido mamario: Detección de moléculas qPCR.	16
3. Objetivos	17
3.1 Objetivos particulares	
4. Hipótesis	17
5. Metodología	18
5.1 Recolección de muestras	
5.2 Extracción de RNA	
5.3 Separación electroforética de RNA	
5.4 Cuantificación de RNA por espectrofotometría	
5.5 Tratamiento de la muestra y síntesis de cDNA por qPCR	
5.6 Diseño de oligonucleótidos	
5.7 Amplificación y estandarización de oligonucleótidos por qPCR	
5.8 Análisis de disociación de genes amplificados	
5.9 Separación electroforética de genes amplificados por qPCR	
5.10 Amplificación de secuencias en muestras de cDNA por qPCR y análisis por curva de disociación.	
5.11 Análisis estadístico del amplificación por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$	

5.12 Validación de reacciones de qPCR	
5.13 Secuenciación de Sanger	
6. Resultados	31
6.1 Electroforesis de RNA	
6.2 Espectrofotometría de RNA	
6.3 Estandarización de oligonucleótidos	
6.4 Amplificación de fragmentos por qPCR	
6.5 Análisis de disociación de genes amplificados	
6.6 Validación de reacciones de qPCR	
6.7 Secuenciación de Sanger	
7. Discusión	42
8. Conclusiones	48
9. Referencias Bibliográficas	49
10. Bibliografía	54
11. Anexos	56
12. Índice de figuras, tablas y gráficos	62

RESUMEN

El cáncer de mama es un grave problema de salud global debido a su alta prevalencia y su impacto en las mujeres, siendo una de las principales causas de muerte entre ellas. La investigación se centra en entender su diagnóstico, mecanismos y tratamiento, y utiliza modelos celulares y animales, como las ratas, que son similares a los humanos en cuanto a tumores mamarios espontáneos.

La expresión génica se emplea para identificar tipos de tumores mamarios mediante patrones genéticos, proporcionando información sobre procesos celulares y biomarcadores cancerígenos. Además, los cambios metabólicos en las células tumorales, como la glucólisis y el papel de la hexoquinasa II, son cruciales en la progresión del cáncer de mama. También se investiga la influencia de canales de potasio Kv1.1 y Kv1.3 en este tipo de cáncer y su regulación apoptótica.

Este estudio tiene como objetivo principal comprender los patrones de expresión génica en tumores mamarios espontáneos de ratas hembra Wistar, y su relación con el tipo histológico de los tumores. Para lograrlo, se llevaron a cabo una serie de procedimientos que incluyen la preparación de oligonucleótidos, y su estandarización por qPCR, la amplificación de genes de interés, y el análisis de los datos resultantes.

El análisis de expresión génica mostró cuatro perfiles distintos según el tipo de tejido. En los tumores malignos, se observó una sobreexpresión de genes relacionados con la glucólisis, en particular, el carcinoma mostró una mayor expresión de Hk1 en comparación con los otros genes estudiados; en el fibrosarcoma, la hexocinasa Hk1 se expresó aproximadamente el doble, en comparación la hexocinasa Hk2 aproximadamente 2.5 veces más que los otros genes estudiados. Por otra parte, en los tumores benignos sobresale la expresión de canales de potasio. El fibroadenoma se caracterizó por una sobreexpresión significativa de Kcna3, aproximadamente 7 veces más que los demás genes. El fibroquiste se destacó por presentar una sobreexpresión de 18s rRNA y Kcna1, con valores de aproximadamente 2 y 1.6 veces mayores a los demás genes.

El presente estudio identificó diferentes patrones de expresión génica asociados con distintos tipos de tumores mamarios en ratas Wistar, lo que resalta la importancia de comprender la regulación génica en el contexto del cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de tumores espontáneos en mama suele ser un objeto de investigación clínica y médica, esto debido a la aparición de cáncer de mama en la población a nivel mundial. Los tumores mamarios suelen aparecer debido a ciertos factores genéticos, sin embargo, no es el único motivo por el cual se manifiestan ya que las condiciones ambientales, estrés, edad y efectos hormonales contribuyen al desarrollo de esta patología (Shepel & Gould, 1999; Blackshear, 2001; Torre et al., 2015), así como el uso de productos químicos con potencial carcinogénico presentes en el ambiente, comestibles o incluso productos farmacéuticos (Yauk et al., 2020). Aunque se trata de una anomalía sin distinción de género, es cierto que predomina en la población de sexo femenino debido a las condiciones hormonales que presentan, y conforme hay un aumento en la edad hay mayor riesgo de la presencia de un tumor o incluso el desarrollo de cáncer (Blackshear, 2001; Torre et al., 2015).

El cáncer de mama es de gran importancia en la mujer debido a que más del 10% de las mujeres a nivel mundial llegan a desarrollarlo (Shepel & Gould, 1999), y es la segunda causa de muerte en personas de sexo femenino (Blackshear, 2001). Debido a que se trata de un tema de suma relevancia para la población femenina, los estudios de investigación abundan para tener un mejor conocimiento sobre el diagnóstico, mecanismo y tratamiento de esta patología; sin embargo es necesario acudir a modelos animales o celulares que contribuyen al entendimiento de esta afección.

En cuanto al estudio en temas de salud, los investigadores han optado por un modelo murino para diferentes patologías, ya que presentan suficiente información similar a un humano para obtener datos experimentales que sean de utilidad (Abbott, 2004). Se han generado modelos de tumores mamarios en roedores para simular la morfología y mecanismo como sería en el caso de un cáncer mamario de humano (Blackshear, 2001), sin embargo, la presencia de tumores espontáneos en ratas ha sido de gran ayuda para ampliar los conocimientos de estudio sobre el cáncer de mama o simplemente de los tumores espontáneos (Bomhard & Rinke, 1994). Los modelos murinos son ampliamente utilizados para estudios cardiovasculares o metabólicos debido a la similitud del mecanismo con el cuerpo humano; sin embargo a lo largo de los años y tras diferentes estudios realizados se ha observado que el modelo animal de rata presenta mayor identidad con el humano que un modelo de ratón (Shepel & Gould, 1999) debido a que en cuanto a la histología el carcinoma en ratones tiene menor grado de agresividad que en el humano; mientras que en las ratas se asemeja el tipo de tumor y la gravedad de la patología (Blackshear, 2001), incluso la aparición de los tumores espontáneos en hembras y la edad frecuente de desarrollo de estos concuerda con los datos reportados en humanos (Bomhard & Rinke, 1994).

Se han empleado diferentes tipos de estudios, sin embargo, el análisis de expresión de genes ha sido uno de los más empleados para la investigación (Yauk et al., 2020). Y si bien de manera tradicional la diferenciación de los tipos de tumores se ha abordado desde un punto histológico, en este trabajo se abordará un enfoque en el cual a través de un patrón de expresión de genes se determine el tipo de tumor mamario espontáneo que se está generando en el modelo de interés. Un perfil de expresión podría abarcar un sin fin de genes, dependiendo del tejido y enfoque que se le pretenda dar, en este caso se hace énfasis en algunos genes que se ven implicados en procesos energéticos y de comunicación celular.

Las células tumorales presentan cambios metabólicos dependientes de su fenotipo, lo que les genera diferencias en su proliferación y resistencia a señales de muerte celular; estos fenotipos incluyen mayor empleo de glucosa debido a la alteración de vías de metabolismo, glucólisis y señalización (Liet al., 2015). La reprogramación metabólica o alteración del metabolismo, es una de las características más comunes de los tumores y del cáncer (Ishfaq et al., 2022). De esta forma la glucólisis del cáncer es un paso clave en la activación oncogénica y la progresión tumoral, donde la glucólisis conduce a la descomposición de las moléculas de glucosa en piruvato, con la ayuda de la hexoquinasa (Hk) de la cual existen varias isoformas, que están codificadas por sus genes específicos (Li et al., 2015; Ishfaq et al., 2022). Hay cuatro isoenzimas de Hk en tejidos de mamíferos designados como tipo I, II, III y IV, de las cuales las primeras 3 son similares en sus masas moleculares, sin embargo, la HkII es la más asociada con el estudio del cáncer y al efecto Warburg (Katabi et al., 1999; Brown, 2002; Li et al., 2015; Tan & Miyamoto, 2015). En estudios de cáncer de mama se ha investigado el papel de la expresión de la HkII (Ishfaq et al., 2022), así mismo se ha visto que los canales dependientes de voltaje de potasio se ven implicados en la proliferación celular y apoptosis lo que los involucra en la generación de tumores (Brevet et al., 2008), especialmente canales como Kv1.1 y Kv1.3 han reflejado un patrón entre la apoptosis y el cáncer de mama.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia del estudio de mama

El tejido mamario es una estructura vital y compleja que desempeña un papel fundamental en la salud de la mujer. Su estudio exhaustivo y detallado ha sido objeto de investigación constante debido a su relevancia en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades mamarias, en particular el cáncer de mama, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en mujeres a nivel mundial.

La importancia de investigar el tejido mamario radica en su capacidad de proporcionar información crucial sobre la fisiología y patología mamaria a través del análisis de biomarcadores específicos, perfiles metabólicos, expresión génica y otras características bioquímicas (Hanahan & Weinberg, 2011). Estos estudios no solo permiten la identificación de factores de riesgo y la predicción de la respuesta al tratamiento, sino que también abren nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias personalizadas y la búsqueda de posibles dianas terapéuticas.

El análisis del tejido mamario proporciona información crucial para un diagnóstico preciso de diversas enfermedades mamarias: microcalcificaciones, mastitis, nódulos, fibroadenomas, fibroquistes, o tumores diversos, incluido el cáncer de mama. Hablando en particular de esta última patología, se conoce que es una de las tipologías de cáncer más frecuentes en la mujer (Ramos et al., 2015). Sumado a esto, en México el cáncer representa un problema de salud grave debido a la gran cantidad de fallecimientos asociados a este, además de que en las mujeres mexicanas, el cáncer de mama ocupa el 25% de los casos (Arceo et al., 2021). Es importante enfatizar en el hecho de que esta población no alcanza a obtener un diagnóstico oportuno, es por ello que la evaluación histopatológica, el análisis de biomarcadores y las pruebas moleculares que ayudan a diferenciar los tipos de tumores, son fundamentales para establecer un enfoque terapéutico adecuado y personalizado.

2.2 La mama y alteraciones en modelo experimental murino

2.2.1 Rata Wistar y tejido mamario

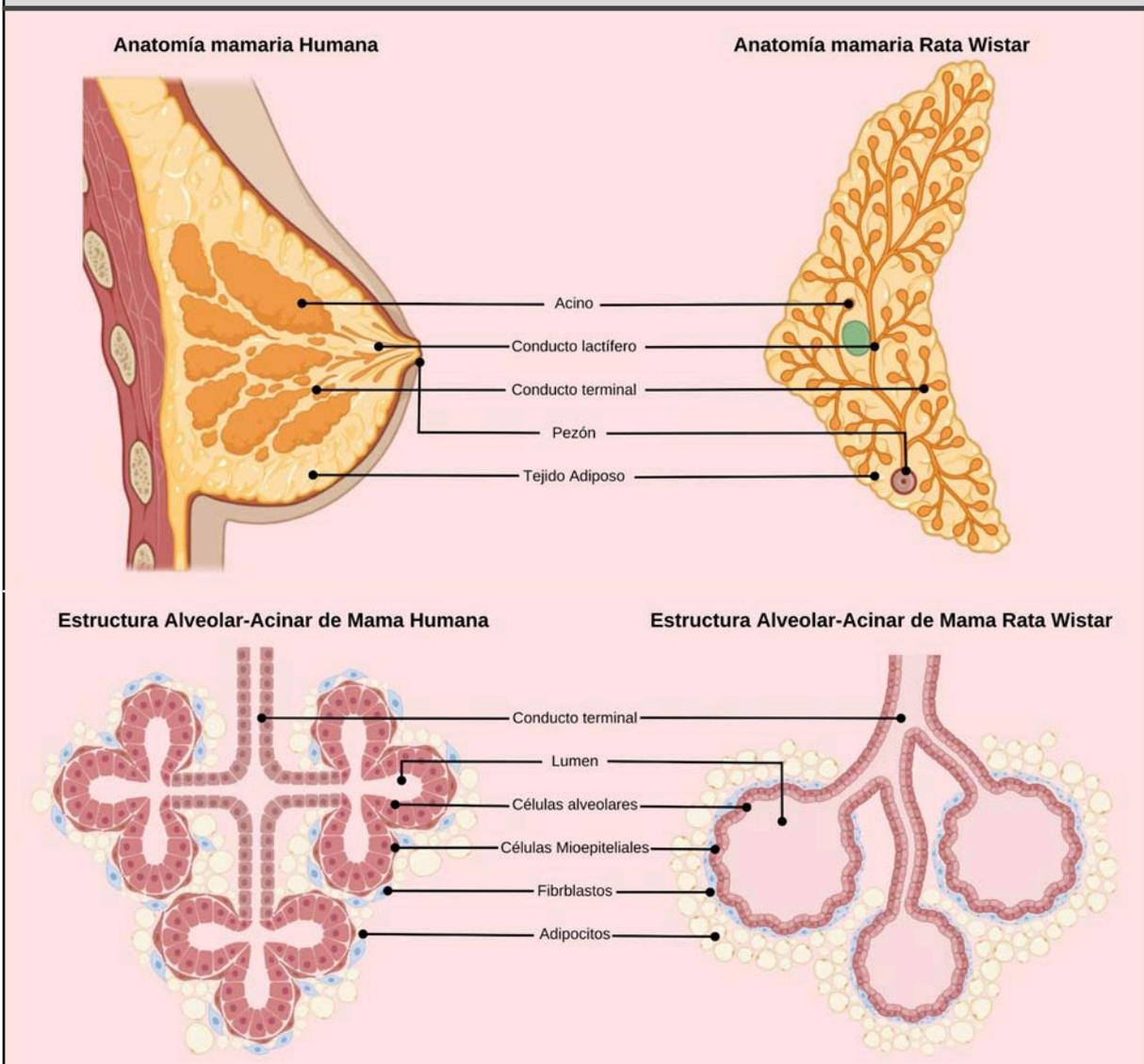
Las ratas Wistar, una cepa de ratas albinas desarrollada en el Instituto Wistar de Filadelfia, Estados Unidos, han desempeñado un papel fundamental en la investigación científica durante décadas (Animal Welfare Information Center, 2021). Este tipo de roedores se han convertido en una herramienta indispensable en diferentes campos de estudio debido a su utilidad en el estudio de aspectos biológicos, fisiológicos y farmacológicos de enfermedades humanas (Sengupta, 2011; Cossio et al., 2013).

En la investigación, este roedor permite tener un control estricto de variables que permiten conseguir resultados reproducibles, como la edad, el sexo y el peso.

Dentro de las áreas en que la investigación se apoya del uso de este tipo de roedores se encuentra el estudio de enfermedades cardiovasculares, neurológicas, y el cáncer, dentro de este último claramente se incluyen los estudios realizados para cáncer de mama (Shepel & Gould, 1999; Animal Welfare Information Center, 2021). Debido a esto se refiere a la subespecie *Rattus norvegicus* var. albina como un excelente modelo para el estudio de tumores mamarios, debido a su similitud con el tejido humano, como se muestra en la figura 1.

Figura 1.

Comparación anatómica e histológica entre la mama humana y la rata Wistar.



Nota. En la parte superior se muestran las diferencias anatómicas entre ambas especies, sin embargo en sí poseen las mismas estructuras por lo cual la función que ejercen es similar. En la parte inferior se muestra la comparación histológica entre las especies, las cuales poseen estructuras histológicas similares, difiriendo en la forma de los acinos, sin embargo las estructuras celulares que las componen son similares.

La similitud entre la fisiología e histología de la mama del humano con este modelo animal es lo que lo hace óptimo para el estudio de tumores mamarios. Tanto en la rata Wistar como en el humano las glándulas mamarias se forman desde la etapa embrionaria a partir del ectodermo (Galbarro, 1991; Möller & Vazquez, 2011). En contraste con el humano, la rata posee 6 pares de mamas, las cuales 3 de ellas se encuentran distribuidas en la región torácica anterior, y 3 en la región abdominal-inguinal anterior. Al llegar a las 12 semanas el tejido mamario se ha desarrollado en su totalidad y permanece de esta manera en animales longevos (Honvo & Truchet 2015).

2.2.2 Tumores espontáneos en modelo murino

Existen diferentes maneras en las que se puede presentar la aparición de tumores en los animales de laboratorio. Algunas cepas de roedores han sido modificadas al paso de los años para presentar un tipo específico de tumor mamario para así reproducir la morfología y mecanismo de los tumores humanos (Blackshear, 2001); sin embargo dentro de los métodos empleados para el estudio de la mama se ha empleado por una tumorigénesis espontánea.

Es importante destacar que hay factores que intervienen en la tumorigénesis, como el sexo, ya que al pertenecer al sexo femenino hay un incremento de probabilidad de presentar tumores en el tejido mamario (Bomhard & Rinke, 1994; Calero, 1999). Unido a esto se encuentran factores hormonales que tienen que ver con la menarquia precoz y el momento del primer embarazo, ya que se ha demostrado que un menor tiempo entre estas dos etapas reduce la probabilidad de presentar tumores mamarios, debido a la producción de estrógenos que condiciona el crecimiento del tejido epitelial de la mama (Calero, 1999).

Entre otro tipo de factores se encuentran los genéticos, que se ha visto que tienen que ver con la susceptibilidad al cáncer dada por genes como *BRCA1* y *BCRA2* (Miguel et al., 2016); que acompañados por factores ambientales o tóxicos favorecen el crecimiento de tumores, se ha visto que el potencial de productos químicos a través de la exposición ambiental en agua, aire, alimentos, fármacos, productos de consumo; propician la aparición de tumores (Shepel & Gould, 1999; Blackshear 2001; Yauk et al., 2020).

Otro factor a considerar es la edad, ya que se ha observado que posterior al haber alcanzado una edad óptima de reproducción sexual las probabilidades de presentar tumores en mama aumentan, es decir que, la edad es un factor sumamente importante y determinante para la aparición de tumores mamarios (Bomhard & Rinke, 1994; Calero, 1999; Blackshear, 2001; Gava et al., 2002; Torre et al., 2015; Miguel et al., 2016).

La aparición de tumores espontáneos se trata de un proceso multifactorial en el cual diferentes variables contribuyen para presentar esta patología (Blackshear, 2001; Miguel et al., 2016). Sin embargo, en las ratas se asocian factores ambientales específicos que contribuyen a la formación de tumores; estos son tratamientos químicos prolongados (Subramanian & Kotharia, 1991), incremento de peso por el consumo de alimento *ad libitum* (Gries & Young, 1982; Haseman & Rao, 1992), condiciones estándar de laboratorio que limitan la actividad física (Alessio et al., 2009), además de una constante reproducción que conlleva a la producción de hormonas antes mencionadas.

2.2.2.1 Fibrosarcomas

Los fibrosarcomas mamarios son tumores malignos poco frecuentes que se originan en el tejido conectivo de la mama, principalmente en el estroma y el tejido fibroso. Son una variante rara del cáncer de mama, representando aproximadamente el 1% de todos los tumores malignos de mama (Ramia, 2000; Alvarado et al., 2010). Los fibrosarcomas mamarios son más comunes en mujeres de mediana edad, pero pueden afectar a mujeres de cualquier edad. Su incidencia es baja en comparación con otros tipos de cáncer de mama (Alvarado & Granados, 2010).

Este tipo de tumor se caracteriza por la proliferación anormal de células mesenquimales que forman un patrón de crecimiento en espiral o en "haz de fascículos" de células fusiformes (McGregor et al, 1994; Alvarado & Granados 2010). La presencia de mitosis atípicas y áreas de necrosis son hallazgos comunes en la histología del tumor. Aunque el origen exacto de los fibrosarcomas mamarios no está claro, se cree que se originan en el estroma mamario a partir de células mesenquimales indiferenciadas o fibroblastos mutados (McGregor et al., 1994).

Estudios genéticos han identificado diversas alteraciones cromosómicas y mutaciones en genes específicos, como *TP53* y *PTEN*, asociadas con el desarrollo del fibrosarcoma mamario (Gutman et al., 1994).

2.2.2.2 Carcinoma

El carcinoma de mama es un tipo de cáncer que se origina en las células epiteliales de la mama (Marzo & Vela, 2018). Es el cáncer más común en mujeres, y puede afectar también a hombres en menor proporción (Maffuz et al., 2017). El carcinoma de mama es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial, se estima que afecta a millones de personas cada año y es una de las principales causas de morbimortalidad en mujeres (Maffuz et al., 2017; OPS-OMS, 2021).

Mutaciones en genes como *BRCA1* y *BRCA2* se asocian con un mayor riesgo de carcinoma de mama y pueden heredarse de generación en generación (Marco et al., 2020). La exposición prolongada a estrógenos, así como factores reproductivos como la edad del primer embarazo y el número de estos, pueden influir en el riesgo de desarrollar carcinoma de mama (Maffuz et al., 2017; Marco et al., 2020; OPS-OMS, 2021).

Existen distintas variaciones del carcinoma, como carcinoma ductal o lobular, ambos de tipo invasivo; existen otros subtipos menos comunes, como el carcinoma inflamatorio, medular, o metaplásico (Maffuz et al., 2017; Marzo & Vela, 2018). El carcinoma ductal invasivo es el tipo más común de carcinoma de mama y se origina en los conductos mamarios, invadiendo los tejidos circundantes. El carcinoma lobular invasivo se origina en los lóbulos mamarios y tiene una presentación histológica distinta del carcinoma ductal invasivo (Marzo & Vela, 2018; Marco et al., 2020).

2.2.2.3 Fibroadenoma

El fibroadenoma de mama es una lesión benigna y común en mujeres en edad reproductiva, aunque también puede presentarse en mujeres mayores y en adolescentes (Martínez et al., 2009; Corredor Andrés et al., 2018). Se caracteriza por un crecimiento anormal de tejido fibroso y glandular en la mama, generalmente se presenta como una masa palpable, móvil y bien definida, que puede variar en tamaño (Corredor et al., 2018). Es comúnmente asintomático y no causa dolor; pero a pesar de ser benigno, es una condición que puede generar preocupación y ansiedad en las mujeres afectadas (Mayo Clinic, 2022). La investigación es crucial para comprender su etiología, factores de riesgo y comportamiento clínico, lo que permite un manejo clínico más adecuado.

Aunque la causa exacta no se conoce completamente, se cree que los cambios hormonales y factores genéticos pueden contribuir al desarrollo de fibroadenomas. La edad, la historia familiar de fibroadenomas o cáncer de mama, la nuliparidad (no haber tenido hijos), y la terapia hormonal pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de fibroadenomas (Hamajima et al., 2012; Corredor et al., 2018).

Existen dos tipos identificados de fibroadenoma, el simple y el complejo; el primero es el tipo más común y está compuesto por tejido fibroso y glandular sin cambios atípicos. Por otro lado, el complejo presenta cambios histológicos adicionales, como hiperplasia ductal o presencia de calcificaciones (Martínez et al., 2009).

2.2.2.4 Fibroquiste

Los fibroquistes de mama son lesiones benignas comunes que se forman debido a cambios hormonales en el tejido mamario, son más frecuentes en las mamas de mujeres en edad reproductiva, especialmente en mujeres entre 30 y 50 años (Gallo et al., 2013; Fernández et al., 2015). Se caracterizan por la presencia de quistes llenos de líquido y tejido fibroso en la mama. Los fibroquistes generalmente se presentan como masas mamarias palpables, que pueden variar en tamaño y ser, o no, dolorosas (Táboas Álvarez et al., 2019).

Los cambios hormonales, especialmente las fluctuaciones en los niveles de estrógeno y progesterona, juegan un papel importante en la formación de los quistes mamarios. Factores como la edad, el uso de anticonceptivos hormonales, y el

consumo de cafeína han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar fibroquistes de mama (Fernández et al., 2015).

2.3 Moléculas asociadas a alteraciones en tejido mamario.

2.3.1 Hexocinasas

Las hexoquinasa (Hk) son enzimas conservadas evolutivamente, cuya función es fosforilar a la glucosa 6-fosfato (G6P), siendo la enzima que cataliza uno de los primeros pasos del metabolismo de la glucosa, desempeñando un papel clave en la producción de ATP (Tan & Miyamoto, 2015; Wu et al, 2020; Ciscato et al, 2021).

Dentro de este grupo de enzimas se han caracterizado principalmente 4 isoenzimas en mamíferos, presentan una gran similitud estructural aunque difieren en sus funciones (Wilson, 2003; Wu et al., 2020). De las cuales I-III presentan una mayor similitud respecto a sus masas moleculares de aproximadamente 100 kDa, sumado a esto, tienen alta afinidad por la glucosa y son susceptibles a la inhibición del producto por la G6P (Brown et al., 2002; Wilson, 2003); a comparación de la isoenzima IV, debido a que se encuentra en tejidos sensibles a la glucosa como hígado y páncreas (Irwin & Tan, 2008). Específicamente en roedores, HkI se expresa en el cerebro y riñón, mientras que la isoenzima II se encuentra en tejidos sensibles a la insulina así como tejido adiposo y corazón; por otra parte en hígado sano HkIV es la forma más abundante (Katabi et al., 1999). Además de esto HkI y HkII están asociados con las mitocondrias mientras que HkIII se encuentra en la periferia del núcleo (Brown et al., 2002).

Ha sido descrito que una mayor expresión de las isoenzimas I y II se asocia a tumores malignos (Brown et al., 2002), esto debido a que una característica de las células tumorales con un crecimiento acelerado es el empleo de la glucosa para la producción de energía, y así mantener una alta tasa de división celular en comparación con células normales (Katabi et al., 1999). Las células tumorales presentan cambios metabólicos esenciales para mantener tasas proliferativas y resistir las señales de muerte celular, estos fenotipos tienen una mayor utilización de la glucosa en la energía metabólica (Li et al., 2015; Wu et al., 2020). A dicho fenotipo se le conoce como efecto Warburg, la glucólisis aeróbica es reconocida como un sello distintivo del metabolismo de las células tumorales (Ganapathy, 2017; Gandhi & Das, 2019; Yu et al., 2019; Zhang et al., 2019).

La HkII es la principal isoforma de hexoquinasa expresada en cánceres que exhiben un efecto Warburg, debido a que desempeña un papel central en la captación y utilización celular de glucosa (Li et al., 2022; Ishfaq et al., 2022). Esta isoforma juega un papel importante, no sólo en la glucólisis, sino también en la supervivencia celular, facilita la autofagia en respuesta a la privación de glucosa, además ayuda a inmortalizar las células cancerosas y escapa a la inhibición de la quimioterapia (Tan & Miyamoto, 2015; Li et al., 2022). La observación realizada por el Dr. Otto Warburg sobre las células cancerosas en diferencia de las células normales, acerca de que se someten preferentemente a glucólisis en presencia de un ambiente rico en

oxígeno, fenotipo indicador de la vulnerabilidad metabólica observada en las células cancerosas (Gandhi & Das, 2019; Zhang et al., 2019).

2.3.2 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas ubicadas en la membrana celular (Xu, 2003), cuya función radica principalmente en la comunicación entre dos células. En su mayoría los canales iónicos conectan el citosol con el exterior de la célula, así mismo estos canales poseen poros, los cuales tienen una alta selectividad; además de que debido a su nombre, únicamente son transportadoras de moléculas inorgánicas, es decir iones (Abraham et al., 1999; Alberts et al., 2002). La función de estos canales es permitir el paso de iones inorgánicos específicos como Cl^- , Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} ; este papel es de suma importancia para muchos procesos celulares (Iorio et al., 2002; Alberts et al., 2002).

Como ya se ha mencionado, una de las características más importantes de estos canales es su alta sensibilidad, ya que no permanecen abiertos todo el tiempo, sino que dependiendo del tamaño y carga del ion es que este canal permitirá el paso o no. Existen diferentes tipos de canales iónicos que funcionan de maneras específicas permitiendo o no el paso de estas moléculas inorgánicas (Alberts et al., 2002). En la mayoría de los casos, los canales permiten el paso de las moléculas en respuesta a un estímulo específico. Los principales tipos de estímulos que hacen que los canales iónicos se abran son: cambio en el voltaje a través de la membrana (canales activados por voltaje), estrés mecánico (canales activados mecánicamente), o la unión de un ligando (canales activados por ligando: neurotransmisores, iones, nucleótidos), otros canales están activados por la fosforilación o desfosforilación de proteínas (Abraham et al., 1999; Alberts et al., 2002).

La membrana plasmática de todas las células eléctricamente excitables (neuronas, óvulos, células endocrinas, músculos) contiene canales catiónicos activados por voltaje, que son responsables de generar los potenciales de acción (Milesi & Mobili, 2019; Alberts et al., 2002; Xu, 2003). Estos se generan cuando ocurre una despolarización de la membrana, es decir que el valor de voltaje se hace menos negativo; la membrana en forma basal tiene un voltaje de -70v , por lo que una disminución de ese valor negativo (por ejemplo a cero), significa que la membrana se está despolarizando. En ocasiones la despolarización de la membrana desencadena una apertura significativa para iones Na^+ , lo que ocasiona una mayor despolarización y un impulso más lento ya que tarda en regresar a su potencial inicial, los canales de K^+ dependientes de voltaje proporcionan un segundo mecanismo que permite que la membrana plasmática activada regrese de una forma más rápida a su potencial negativo original (Milesi & Mobili, 2019).

Los canales de potasio (K^+) son una clase muy diversa de canales iónicos en la membrana plasmática, se han descrito más de 10 familias de estos canales (Alberts et al., 2002; Gaudet et al., 2011). La familia correspondiente a canales dependientes de voltaje, además de ser de suma importancia para procesos celulares de

comunicación celular, son un objeto de estudio para muchas enfermedades debido a que contribuyen a la regulación de la proliferación celular y la apoptosis y también involucrados en la generación de tumores y el crecimiento maligno (Xu, 2003; Xu et al., 2004; Brevet et al., 2008).

El canal de potasio activado por voltaje Kv1.3 (Kcna3), es el miembro 3 pertenece a la subfamilia relacionada con agitadores (Xu, 2003), cuya función se ha establecido como habilitador de la actividad del canal de potasio rectificador retrasado y la actividad del canal de potasio rectificador hacia afuera, además de participar en el transporte transmembrana de iones de potasio (Vicente, 2005; NCBI, 2023). Se encuentra ubicado en el cromosoma 3 de los ratones *Rattus Norvegicus* (106943485 - 106945386), posee un tamaño de 1,90 kilobases (kb) (NCBI, 2023), y es ortólogo al *KCNA3*, miembro 3 de la subfamilia A de canales dependientes de voltaje de potasio (Gaudet et al., 2011; NCBI, 2023). Este canal se expresa en varios tejidos, incluidos el adiposo y el músculo esquelético, además de linfocitos, sistema nervioso central, riñón, hígado (Xu, et al, 2004). Se ha postulado su participación en procesos como apoptosis, proliferación celular, y regulación de células T (Xu, 2003; Xu et al., 2004).

El gen *Kcna1* codifica una proteína de canal iónico conocida como Kv1.1. Esta proteína forma parte de los canales de potasio activados por voltaje y está involucrada en la regulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión de señales eléctricas en el sistema nervioso (Rgd, 2022; Ferrer, 2015). El gen *Kcna1* y su producto, la proteína Kv1.1, desempeñan un papel fundamental en el control del potencial de membrana y la propagación de los potenciales de acción en neuronas y otros tipos de células excitables (Rgd, 2022; Abraham et al., 1999). El gen está ubicado en un *locus* específico del cromosoma 11 en humanos (en ratones, se encuentra en el cromosoma 9). Tiene una estructura de exones e intrones que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína Kv1.1 (Rgd, 2022), forma un canal iónico transmembrana que permite el flujo de iones potasio fuera de la célula, lo que contribuye a la repolarización de la membrana y la recuperación del potencial de reposo después de un potencial de acción (Abraham et al., 1999).

2.3.3 Unidad ribosomal 18s

El 18S rRNA es una molécula de ácido ribonucleico (RNA) que forma parte de la subunidad menor del ribosoma en eucariotas. Es esencial en el proceso de síntesis de proteínas y juega un papel fundamental en la traducción del código genético. Es responsable de facilitar la unión del ribosoma con el ARN mensajero (mRNA) durante la traducción, lo que permite la síntesis de proteínas a partir de la información genética codificada en el mRNA (Cooper, 2000; Alberts et al., 2002; Sharma, 2022; Brown et al, 2002).

El 18S rRNA tiene una estructura tridimensional altamente plegada y compleja, con regiones conservadas y variables que desempeñan funciones específicas durante el proceso de traducción (Brown et al, 2002). Se encuentra principalmente en el citoplasma de la célula, donde se ensambla junto con proteínas ribosómicas para

formar la subunidad menor del ribosoma (Cooper, 2000; Alberts et al., 2002). La expresión del 18S rRNA está regulada de manera fina en respuesta a las necesidades celulares y puede variar según el tipo celular y las condiciones ambientales (Alberts et al., 2002; Brown et al., 2002).

2.4 Métodos de detección de alteraciones en tejido mamario: Detección de moléculas por qPCR cuantitativa

La qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) es una técnica de biología molecular que permite la amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente ARN, para determinar la expresión de genes específicos en muestras biológicas. Es una técnica altamente sensible y específica que permite una detección y cuantificación precisa de ARN o ADN en muestras complejas. La qPCR cuantitativa es una herramienta poderosa para investigar la expresión génica y la regulación de genes en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Permite estudiar la dinámica de expresión de genes en respuesta a estímulos y el impacto de enfermedades en la expresión de moléculas específicas (Zhang et al., 2016; Sánchez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021; Ishfaq et al., 2022).

Consta de 3 pasos básicos: transcripción inversa, amplificación, detección y cuantificación de los productos de la PCR: ésta última la hace una reacción de suma importancia e interés para los estudios de biología molecular debido a que brinda datos reales y altamente sensibles en tiempo real, lo que permite conocer datos exactos en cada paso de la reacción. La primera etapa consiste en la conversión del ARN en ADN complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa. Este paso permite la amplificación del ARN y el análisis de su expresión. La segunda etapa es la amplificación donde se utiliza la enzima DNA polimerasa para amplificar selectivamente el cDNA específico del gen de interés; la reacción se realiza mediante ciclos de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión. La última etapa consiste en la detección de los productos amplificados mediante la incorporación de sondas de fluorescencia o colorantes intercalantes en la reacción; la cuantificación se realiza mediante la comparación del ciclo umbral (Ct) de amplificación del gen de interés con un gen de referencia.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar los niveles de expresión génica de moléculas asociadas a tumores en ratas Wistar hembra (*Rattus norvegicus*) con tumores mamarios espontáneos con el fin de establecer un perfil de expresión génica asociado al tipo histológico del tumor.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el diseño de oligonucleótidos para los genes de hexocinasas (Hk1, Hk2, Hk3), canales de potasio (Kcna1, Kcna3), y subunidad ribosomal (18s rRNA); a través del uso de herramientas bioinformáticas.
2. Estandarizar los procedimientos de qPCR, con el fin de optimizar y generar futuras reacciones de amplificación.
3. Amplificar los genes estudiados con muestras provenientes de diferentes tipos histológicos de tumores de mama espontáneos en ratas hembra Wistar longevas, a través de la realización de qPCR.
4. Calcular el nivel de expresión en los tumores espontáneos, mediante el método de Livak: $2^{-\Delta\Delta CT}$
5. Desarrollar el análisis de expresión diferencial y su asociación con la histología de tumores espontáneos.

4. HIPÓTESIS

Los tumores de rata con fenotipos más agresivos, como el carcinoma y el fibrosarcoma, exhibirán niveles de expresión más elevados de los genes hexoquinasas (Hk1, Hk2) en comparación con los tumores de fenotipos menos agresivos, como la fibrosis quística y el fibroadenoma. Se espera que esta mayor expresión de los genes hexoquinasas refleje un comportamiento tumoral más agresivo en los tumores estudiados. Así mismo, se espera que la sobreexpresión de genes para canales de potasio (Kcna1, Kcna3) y la subunidad ribosomal 18sRNA (18s rRNA) sean asociados con una mayor proliferación celular en el caso de los tumores correspondientes a una fibrosis quística o fibroadenomas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Recolección de muestras

La extracción de tejido se realizó por parte del departamento de posgrados de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, el procedimiento realizado se compuso principalmente de la eutanasia de los modelos biológicos. Posteriormente se prosiguió con la autopsia de las ratas Wistar, en la cual el tejido de interés fue retirado del biológico y aislado en microtubos en 1 mililitro (mL) suspendidos en solución comercial TRI Reagent®.

5.2 Extracción de RNA

Se efectuó la extracción de RNA siguiendo el método descrito por Chomczynski-Sacchi, para lo cual se suspendió nuevamente cada una de las muestras por separado en microtubos con 1 mililitro (mL) de la solución comercial TRI Reagent®, de la casa comercial SIGMA Life Science. Este reactivo consiste en una solución monofásica cuyos componentes comprenden fenol y tiocianato de guanidina, debido a esto, se posiciona como un método ideal para la extracción de RNA, gracias a su capacidad de lisar las células y de inhibir la acción de enzimas RNAsas que degradan el material genético de nuestro interés, de esta manera ayuda a aislar el RNA de las proteínas y el DNA.

La cantidad de muestra prevista se fragmentó de manera proporcional debido al tamaño del tejido, se resuspendieron los fragmentos por separado en microtubos con 200 microlitros (μL) de la solución TRI Reagent®, posteriormente se procedió realizó la extracción por maceración durante aproximadamente 10-15 minutos (min) por muestra, dependiendo de la consistencia del tejido.

Continuando con la metodología de extracción, una vez disgregado el tejido se adicionaron a cada microtubo 200 μL de cloroformo, posterior a esto se realizó una agitación vigorosa en vórtex a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 segundos (seg), se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Se prosiguió a realizar la centrifugación en Microcentrífuga VELOCITY 18R de METRIX® a una velocidad de 12,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C para permitir la separación de las fases y facilitar la recuperación de la fase acuosa que contiene la molécula de interés (RNA), dicha fase se encontró en la parte superior de los microtubos empleados. Esto se debe a que las tres fases resultantes agrupan a RNA, DNA y proteínas y otros compuestos celulares, en orden de superior a inferior debido al peso de las moléculas.

Una vez que se realizó la separación de la fase acuosa de cada una de las muestras se disponen en microtubos etiquetados previamente para su tratamiento eficaz, se le adicionó 100 μL de reactivo isopropanol para ocasionar la precipitación del RNA, se permitió la incubación durante 10 minutos y se prosiguió a realizar la centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C. Posterior a esto, se decantó

el sobrenadante y se continuó con la purificación del RNA con etanol frío al 75% para seguir proporcionando las condiciones de precipitación de esta molécula, esto se llevó a cabo realizando tres series de lavado del pellet con 500 μ L de etanol al 75% seguido de centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min a condiciones de 4°C, y se decantó el sobrenadante para eliminar impurezas que quedaron en el microtubo con la molécula de interés. Una vez obtenido el pellet se deseca a condiciones ambientales hasta el momento de la solubilización y síntesis de cDNA.

5.3 Separación electroforética de RNA

Para visualizar los segmentos de RNA se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.5 %, preparado a 50 mL de solución TAE 50X, posterior a ello se llevó la mezcla al microondas por intervalos de 5 a 10 segundos para evitar el derrame y burbujeo de la solución; se dejó enfriar un poco la solución mientras se añadía el colorante SYBR Safe. Una vez que se tuvo lista la agarosa, se vertió en la cámara de electroforesis Owl de Thermo Scientific™, ya gelificado se retiraron los peines para generar los pocillos y se continuó con el llenado de los mismos. Una vez listo se programó a 120 voltios (V) por 20 min., se realizó la corrida correspondiente. Terminado el proceso se traspasa el gel de electroforesis a un transiluminador de luz azul de Major Science, que se trata de una cámara de revelado para luz UV en la cuál se analizaron los fragmentos generados donde se pudieron apreciar los diferentes tipos de RNA según su complejidad molecular.

5.4 Cuantificación de RNA por espectrofotometría

Con el fin de conocer la cantidad de RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría el RNA de cada una de las muestras extraídas, para esto fue necesario realizar la solubilización del pellet, por lo que se suspendió cada una de las muestras en 50 μ L de H₂O libre de nucleasas de la casa comercial Promega®, asegurando la integridad de la molécula de interés.

Una vez solubilizado el RNA se adicionaron 2 μ L de cada una de las muestras en la microplaca correspondiente al equipo EPOCH™ de BioTek®, utilizando el software Gen5. La condición de lectura fue a 260 nanómetros (nm), debido a que a esta longitud de onda se absorben con mayor eficacia los ácidos nucleicos, así mismo el software se programó para la lectura de 260/280 nm para obtener los datos referentes a la pureza del RNA extraído.

Dentro del llenado de la microplaca de electroforesis se utilizó una muestra blanco con la solución de H₂O libre de nucleasas para considerar la solución base de solubilización de cada una de las muestras; posteriormente se introdujo al equipo para realizar la cuantificación.

5.5 Tratamiento de la muestra y síntesis de cDNA por PCR

Para optimizar la calidad de las muestras se realizó un tratamiento mediante DNAsas para eliminar cualquier residuo de DNA de estas, por lo cual se tomó cierta cantidad de RNA (dependiendo la muestra y su concentración) para estandarizar a

una concentración de 500 ng/ μ L. Se empleó el kit de la casa comercial Promega® RQ1 RNase-Free DNase, para lo cual se adicionó buffer de reacción 10x, enzima RQ1 RNase-Free DNase, H₂O libre de nucleasas y se llevaron a cierto volumen especificado a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. <i>Estandarización de las muestras para tratamiento con DNAsas</i>				
Reactivo	Carcinoma	Fibrosarcoma	Fibroadenoma	Fibroquiste
RNA (μ L)	5.4	16	7.6	2.1
Buffer 10x (μ L)	1	1	1	1
Enzima (μ L)	1	1	1	1
H ₂ O (μ L)	2.6	2	---	5.9
Volumen total (μ L)	10	20	10	10

Posteriormente se llevaron los microtubos a un baño de incubación de 37°C por 15 min en el equipo Multi-Block Heater™, seguido de este paso se agregó 1 μ L de la solución de paro de reacción (RQ1 DNase Stop Solution), posteriormente se continuó con la incubación de las muestras a 65°C por 10 min en el mismo tipo de dispositivo empleado en la incubación previa, esto con el objetivo de interrumpir la acción de la enzimática.

Una vez realizado el tratamiento de cada una de las muestras se prosiguió a la síntesis de DNA complementario (cDNA), para lo cual se añadieron al microtubo 5 μ L de RNA tratado, 1 μ L del primer Oligo dT 50 μ M de Invitrogen® por la casa comercial ThermoFisher®, 1 μ L de Mix DNTps 10 mM, y por último H₂O libre de nucleasas para completar un volumen de 10 μ L. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min, y antes de llevar las muestras al termociclador se pasó a un baño de hielo a 4°C por 1 minuto. Como segunda parte para la síntesis se agregaron al tubo 4 μ L First Strand Buffer 5x, 4 μ L MgCl₂ 25 mM, 2 μ L DTT 0.1 M, y 1 μ L de RNaseOUT 5,000 U, antes de añadir 1 μ L del último reactivo que es la enzima Transcriptasa reversa 1,000 U, se llevaron a incubar a un baño de 42°C por 2 minutos. Una vez añadidos todos los reactivos en los microtubos se incubaron en termociclador por el dispositivo MiniAmpPlus™, programado a tres fases: desnaturalización, alineación y elongación, para la primera se estableció una temperatura de 42°C durante 50 minutos, la alineación se realizó a 72°C por 15 minutos, y para la última fase se bajó la temperatura drásticamente a 4°C por 25 min. Terminado el proceso de síntesis se conservaron las muestras en congelación a 4°C hasta su uso.

5.6 Diseño de oligonucleótidos

Para cumplir el objetivo, se consideraron 6 genes, de los cuales se consideró como endógeno a la hexoquinasa en su isoforma 3 (Hk3), canal iónico de potasio dependiente de voltaje en sus isoformas 1.1 y 1.3 (Kcna1, Kcna3), enzimas involucradas en la glucólisis como hexoquinasa en sus isoformas 1 y 2, reportadas en cáncer de mama (Hk1, Hk2), y unidad ribosomal 18s RNA (Rn18s).

El diseño de oligonucleótidos de dichos genes partió con la recopilación de información en la base de datos GenBank del NCBI, esto con el objetivo de incluir todas las variantes que pudiera existir de los genes en el organismo *Rattus norvegicus*. Una vez obtenida la información necesaria se agruparon todas las secuencias FASTA (correspondientes de cada gen), y se colocaron en el programa BioEdit en el cual se alinearon para identificar el fragmento conservado y de esta manera incluir la síntesis de todas las variantes en el oligonucleótido. Posteriormente se llevaron al software de Primer Express de Applied Biosystems donde según la alineación en BioEdit se diseñaron los oligonucleótidos condicionando a un tamaño de 20 pb, temperatura media (Tm) de 60°C, contenido de guanina/citosina entre 50-80%. Por último para asegurar el correcto diseño se llevaron al programa nBLAST de NCBI donde se introdujo la secuencia de los oligonucleótidos y se corroboró que fueran los correspondientes al gen y organismo de interés. El resultado de estos se ve reflejado en la tabla 2.

Tabla 2. <i>Diseño y condiciones de oligonucleótidos</i>						
Gen	Nombre	Tipo	Secuencia	Tm °C (50mM NaCl)	Contenido GC (%)	Tamaño de amplicón
Kv1.1	Canal iónico dependiente de voltaje 1.1	F	5'- GCC CAC TAC AGG CAG GCT AA -3'	59.6	60.0	150
		R	5'- ACA GGA GTC GCC AAG GGT TT -3'	59.2	55.0	150
Kv1.3	Canal iónico dependiente de voltaje 1.3	F	5'- ACC GCA ACA GAC CCA GCT T -3'	59.9	57.9	150
		R	5'- CCT CAC GGA ACT TCT CCA TAG C-3'	57.2	54.5	150
HkI	Hexocinasa 1	F	5'- CTC GGC GGG TCT TCC TTT -3'	57.5	61.1	150
		R	5'- CAG GCA GTC AGC GAC ATG AT -3'	57.6	55.0	150
HkII	Hexocinasa 2	F	5'- CGG GCC CCG CCA GAA -3'	62.2	80.0	150
		R	5'- ACA CAC GTA AGT GGG CAG CAT -3'	59.4	52.4	150
HkIII	Hexocinasa 3	F	5'- AGT GGA TGG GAC GCT CTA CAA -3'	58.0	52.4	150
		R	5'- CAA GCG ACA CGA GTG ACC AA -3'	57.8	55.0	150
18S	Unidad	F	5'- CTT AGC TGA GTG TCC CGC G -3'	68	63.1	150

ribosomal 18s rRNA	R	5'- AAT CAT GGC CTC AGT TCC GA -3'	60	50	150
-----------------------	---	------------------------------------	----	----	-----

5.7 Amplificación y estandarización de oligonucleótidos por qPCR

La solubilización de los oligonucleótidos se realizó siguiendo las indicaciones marcadas en la hoja de especificaciones correspondiente, según lo estipulado por Integrated DNA Technologies (IDT).

Por practicidad y para evitar contaminación de reactivos, se preparó un stock de 200 μL a una concentración 10 μM de cada uno de los cebadores (sentido y antisentido), para posteriormente realizar diluciones a 3 diferentes concentraciones: 0.5 μM , 3 μM , 9 μM , con el objetivo de obtener la concentración estandarizada de cada par de oligonucleótidos para las muestras que se trabajaron, de cada concentración se prepararon 100 μL . Para realizar cada reacción de qPCR se empleó el colorante SYBR Green como agente intercalante en la doble cadena de DNA que permite el análisis espectrofotométrico de la molécula mediante la emisión de fluorescencia, como fuente de dicho agente se hizo uso del reactivo SYBR Green PCR Master Mix el cual es una mezcla que contiene buffer, dNTPs, DNA polimerasa termoestable y el fluoróforo SYBR Green, así mismo se añaden los oligonucleótidos sentido y antisentido correspondientes al gen que se desea amplificar, y H_2O libre de nucleasas; las cantidades de reactivos empleadas para cada una de las reacciones de estandarización de los cebadores se encuentran especificadas en la tabla 3.

Tabla 3. <i>Especificaciones de condiciones de reacción para qPCR</i>	
Reactivo	Cantidad empleada (μL)
SYBR Green PCR Master Mix	6.25
Primer forward	1.25
Primer reverse	1.25
H_2O desionizada	1.75
Muestra de cDNA	2
Volumen total de reacción	12.5

Para cada concentración distinta de cebador se realizaron seis reacciones de qPCR, de las cuales:

- Tres se destinaron a ser blancos de reacción con agua libre de nucleasas para así verificar la formación de dímeros entre cebadores (si fuera el caso) y descartar resultados inespecíficos de la amplificación del fragmento de cDNA,
- Las tres restantes se emplearon para la reacción de amplificación con el cDNA del grupo control previamente sintetizado.

Así mismo se destinaron para cada gen 18 diferentes reacciones de qPCR con nueve tipos de combinaciones entre las concentraciones del cebador sentido y antisentido, el esquema de distribución utilizado para la estandarización fue el descrito en la figura 2.

La preparación de las mezclas de reacción se realizó en una placa de polipropileno virgen puro al 99,9% libre de DNasa/RNasa/DNA humano y no pirogénico, la cual se utiliza en el equipo PrimePro⁴⁸ de Techne por METRIX Laboratorios®, este contiene un software integrado. Se programó siguiendo el siguiente esquema: incubación a 50°C durante 2 min, seguido de la activación de la enzima DNA polimerasa a 95°C por 10 min; posteriormente 40 ciclos de PCR donde se programó a 95°C de 10 seg por ciclo para la desnaturalización del cDNA, y 60°C de 30 seg por ciclo para la el alineamiento y elongación del fragmento amplificado.

5.8 Análisis de disociación de genes amplificados

Una vez que se han amplificado los genes, dentro del mismo ciclo de programación para la qPCR, se empleó para un análisis de alta resolución de fusión. Se programó el termociclador aumentando drásticamente la temperatura a 95°C por 15 seg, seguido de un bajo de temperatura a 55°C por 15 seg., terminando con una temperatura de 95°C por 15 seg. Esto permite obtener una curva de fusión debido a que al incremento de temperatura del DNA previamente amplificado se vuelve monocatenario y resulta en una disminución de la fluorescencia emitida por el colorante impregnado en la molécula.

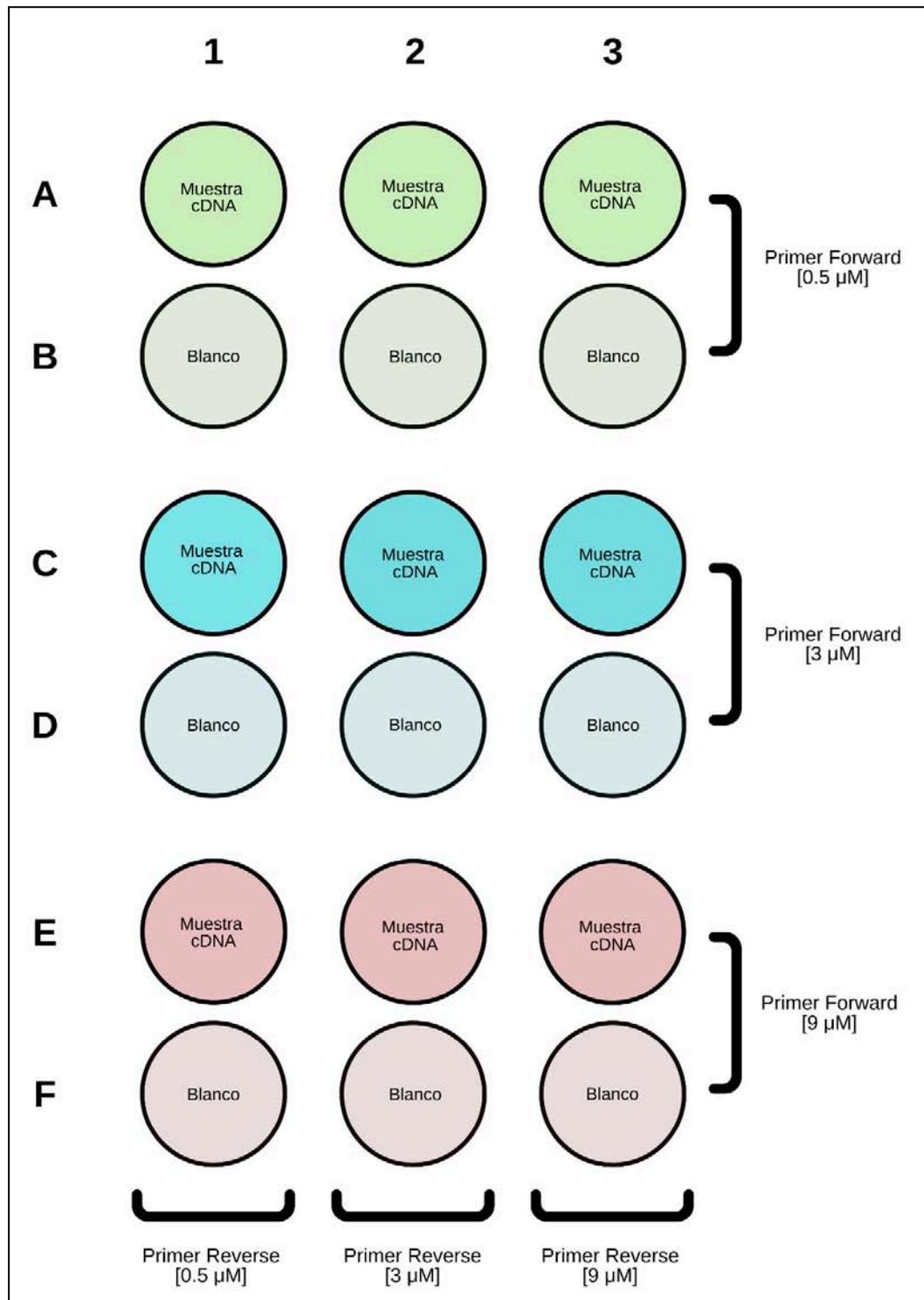
Los resultados obtenidos de acuerdo con los ciclos del termociclador se analizaron por medio de Microsoft Excel y según el gráfico reflejado en cada una de las estandarizaciones para genes se eligió el pico de disociación más alto, descartando aquellos productos de cebadores dimerizados para evitar inexactitudes en futuras amplificaciones.

5.9 Separación electroforética de genes amplificados por qPCR

Al igual que la cuantificación de RNA extraído, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de cada uno de los genes amplificados, de la misma manera que la primera separación. Se suspendieron 3 gr de agarosa en 50 mL de solución de buffer de corrida TAE 50x, se continuó con la metodología planteada en la separación electroforética de RNA, las condiciones de corrida fueron las mismas que se emplearon anteriormente: 20 min a 120 V; y también su visualización en la cámara de luz U.V.

Figura 2.

Esquema de distribución de microplaca para estandarización de genes por qPCR.



Nota: Cada círculo representa un pocillo de la placa. I) Para cada pocillo marcado como “Muestra cDNA” se considera que incluyen 6.25 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 1.25 µL del oligonucleótido sentido correspondiente a la fila en la que se encuentre, 1.25 µL del oligonucleótido antisentido correspondiente a la columna en cuestión, 1.75 µL de H₂O desionizada, y 2 µL de cDNA previamente sintetizado. II) Para cada pocillo marcado como “Blanco” se poseen los mismos

reactivos, en las mismas cantidades a excepción de 2 μ L de cDNA que fueron reemplazados por la misma cantidad de H₂O desionizada. Todos los pocillos poseen un volumen total de 12.5 μ L.

5.10 Amplificación de secuencias en muestras de cDNA por qPCR y análisis por curva de disociación.

El procedimiento de amplificación se realizó siguiendo la metodología empleada para la estandarización de los oligonucleótidos, es decir, se emplearon los mismos reactivos y equipo para la reacción de qPCR, al igual que las mismas condiciones debido a que estas son específicas marcadas por el inserto del reactivo fluoróforo.

Para las muestras de cDNA previamente sintetizadas, se decidió hacer una dilución 1:10 para optimizar los resultados de lectura y optimizar el uso de reactivos, esto se evaluó en las estandarizaciones realizadas para los oligonucleótidos para el grupo control, sin embargo se mantuvo la concentración para cada uno de los grupos.

En cada pocillo de la reacción se siguieron las condiciones marcadas en la tabla 3, sin embargo el orden que se siguió para la reacción se muestra en la figura 3. Debido a que cada placa para reacciones admite 48 reacciones en un solo programa, únicamente se realizó la corrida de un gen por programa donde se incluyen cada uno de los grupos de estudio, esto para evitar errores de lectura entre corridas.

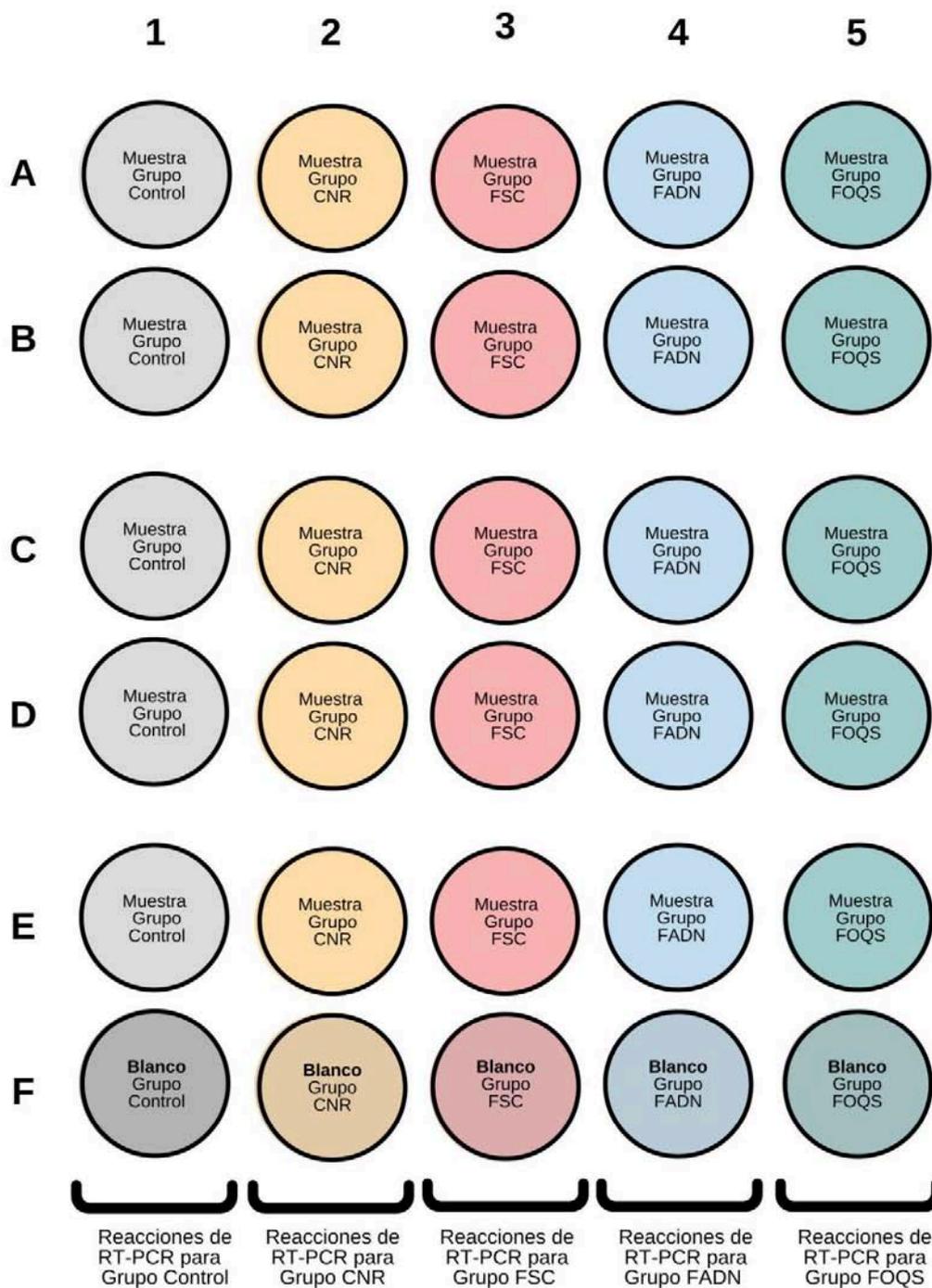
5.11 Análisis estadístico del amplificado por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$

Posterior a la qPCR se obtuvieron datos de Ct, es decir el número de ciclos en que la señal fluorescente se hace evidente, mediante este valor semicuantitativo se establece la presencia del gen de interés, esto sustentado que en una reacción blanco no hay presencia de este valor, mientras que en una muestra, depende de cual se trate el valor varía.

El análisis estadístico se llevó en el programa Microsoft Excel, donde se organizaron los datos siguiendo el método establecido por Livak, donde al valor de Ct de cada gen se le resta el valor del Ct del gen endógeno, en este caso Hk3, dando como resultado el valor de expresión eliminando cualquier interferencia o error que se pudiera obtener al momento de la lectura. Una vez obtenido este dato se prosigue a restar el promedio de Ct correspondiente al gen de mayor Ct (menor expresión) al los valores de los genes estudiados, incluyendo este, de tal manera se iguala a 0 el de mayor expresión. Posterior a esto se emplea la fórmula donde 2 se eleva a la potencia negativa del valor resultado de la resta de los valores anteriores.

Éste método permite hacer una especie de calibración de los resultados de Ct obtenidos, donde el de menor expresión se iguala a 1 y con respecto a este se obtienen datos que representan una cantidad exponencial de sobreexpresión con respecto a otros genes.

Figura 3.
Esquema de distribución de microplaca para amplificación de genes por qPCR.



Nota: Cada círculo representa un pocillo de la placa. I) Para cada pocillo marcado como “Muestra” se considera que incluyen 6.25 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 1.25 µL del oligonucleótido sentido, 1.25 µL del oligonucleótido antisentido, 1.75 µL de H₂O desionizada, y 2 µL de cDNA previamente sintetizado, cada fila representa un grupo de estudio diferente: Control, Carcinoma, Fibrosarcoma, Fibroadenoma, Fibroquiste; en orden de izquierda a derecha. II) Para cada pocillo marcado como “Blanco” se poseen los mismos reactivos, en las mismas cantidades a excepción de 2µL de cDNA que fueron reemplazados por la misma cantidad de H₂O desionizada. Todos los pocillos poseen un volumen total de 12.5 µL.

5.12 Validación de reacciones de qPCR

Para asegurar que las reacciones efectuadas hayan otorgado resultados confiables, se prosiguió a realizar validaciones de estas mediante tres métodos diferentes: diluciones seriadas 1:10, electroforesis en gel de agarosa, y secuenciación de Sanger.

5.12.1 Diluciones seriadas 1:10

A partir del producto de PCR, se aisló el contenido de al menos una de las reacciones realizadas en microtubo para PCR, se etiquetó debidamente de acuerdo al grupo al que pertenece y al gen que se amplifica.

Una vez que se tienen identificados los productos de PCR, se prosiguió a realizar una serie de 5 diluciones 1:10, es decir que del tubo que contenía el producto de PCR se tomaron 2 μ L de este y se diluyeron en 18 μ L de agua destilada, realizando esta acción 4 veces más, tomando los 2 μ L del tubo previo y así obtener las diluciones seriadas.

Realizadas las diluciones se realizó una qPCR siguiendo las condiciones de la tabla 3, en sustitución del cDNA como muestra, se añadió el producto de PCR previamente diluído. Para cada gen de estudio se realizaron 10 reacciones, de las cuales 5 corresponden a productos de PCR y 5 a los blancos de reacción. Debido a la disponibilidad de la placa se efectuó la validación de 3 genes por placa, como se muestra en la figura 4.

5.12.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

Se realizó un gel de agarosa para observar los productos de amplificación de las reacciones de validación a una concentración 1.5%, siguiendo el procedimiento estipulado en partes anteriores, donde se prepararon 50 mL de gel utilizando reactivo TAE 50X, el equipo empleado fue el mismo utilizado anteriormente.

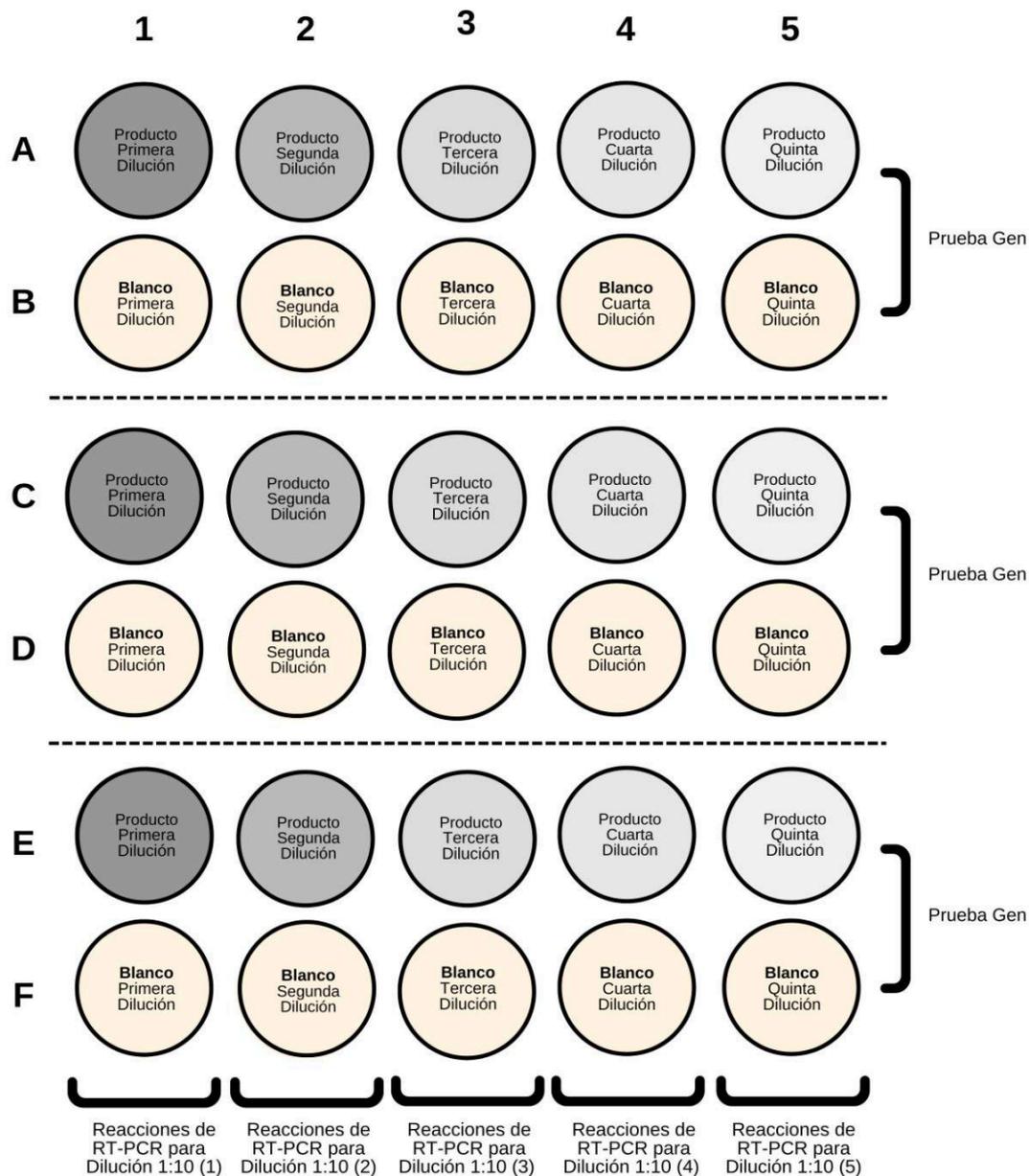
5.12.3 Secuenciación de Sanger

Como un tercer método que asegure la correcta amplificación, se llevó a cabo una secuenciación de Sanger.

Para realizar la reacción de secuenciación y la identificación de genes el producto de PCR, se procedió ejecutar la purificación con el kit de ExoSAP-IT® ThermoFisher Scientific, el cual contiene los siguientes reactivos: exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (*Pandalus borealis*). Estos reactivos forman un buffer de reacción cuyo propósito es llevar a cabo la remoción de oligonucleótidos e hidrólisis de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) remanentes de la PCR. La exonucleasa realiza la degradación de los residuos monocatenarios de los oligonucleótidos o de cualquier otro DNA monocatenario, la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTPs sobrantes de la mezcla de PCR, esto para evitar posibles interferencias en reacciones subsecuentes. Con el fin de llevar a cabo dicha reacción los reactivos se empleó un volumen de 1 μ l del reactivo ExoSAP-IT y fueron mezclados en un microtubo para PCR con 2.5 μ l del producto de PCR.

Figura 4.

Esquema de distribución de microplaca para validación de reacciones por qPCR.



Nota: Cada círculo representa un pocillo de la placa. I) Para cada pocillo marcado como “Producto” se considera que incluyen 6.25 μ L de SYBR Green PCR Master Mix, 1.25 μ L del oligonucleótido sentido, 1.25 μ L del oligonucleótido antisentido correspondiente a la misma fila en cuestión, 1.75 μ L de H₂O desionizada, y 2 μ L de Producto de PCR con la dilución correspondiente a la columna en cuestión. II) Para cada pocillo marcado como “Blanco” se poseen los mismos reactivos, en las mismas cantidades a excepción de 2 μ L de Producto de PCR que fueron reemplazados por la misma cantidad de H₂O desionizada. Todos los pocillos poseen un volumen total de 12.5 μ L.

Una vez que se tuvieron listos los tubos para la reacción de purificación, se procedió a introducirlos en el termociclador previamente a las siguientes condiciones: 15 min a 37°C, 15 min a 80°C y por último una estabilización a 4°C. Como ya se mencionó previamente, el método empleado para la secuenciación fue el de Sanger, este se fundamenta en un método enzimático, con un kit basado en BigDye® terminator v.3.1 cycle sequencing de AppliedBiosystems, este contiene dNTPs marcados con fluorescencia, los cuales se incorporan a la hebra creciente de DNA actuando como terminadores generando fragmentos de DNA de diferentes longitudes marcados con diferente color en el extremo 3'. La mezcla utilizada para la reacción se muestra en la tabla 4.

Una vez que se tuvieron todos los reactivos dentro del microtubo para PCR se mezclaron en Vortex para posteriormente introducirlos al termociclador previamente configurado con las siguientes condiciones de reacción: 1 min a 96°C, seguido de 25 ciclos configurados a 96°C por 30 seg., 50°C por 15 seg., y 60°C por 3 min; la tercera etapa consta de un ciclo de 3 min a 60°C, y termina con la estabilización de la muestra a 4°C.

Tabla 4. <i>Mezcla de reacción para secuenciación de Sanger</i>	
Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de secuenciación	2
Mezcla de ddNTP's	1
Oligonucleotido sentido [10 µM]	1
Producto de purificación	2
Agua libre de nucleasas	2

Como parte final de la reacción y con el fin de purificar y separar los productos de la reacción, fue empleado el sistema limpieza con las columnas CENTRI-SEP™ de LifeTechnologies™, dicha columna tiene un diseño basado en la filtración por gel para la purificación del ADN. Para utilizarla se agregó 1 ml de agua libre de nucleasas, se dejó en reposo hasta que estuviera totalmente hidratada; a continuación se centrifugó a 2,800 rpm durante 2 min., con el fin de eliminar el exceso de agua. En seguida se realizó la suspensión de los productos de PCR en 10 µl de agua libre de nucleasas, transfiriendo a la columna, posteriormente la columna se somete a centrifugación a las mismas condiciones (2,800 rpm por 2 min) colocándola previamente sobre un microtubo de recolección con el propósito de obtener el producto de reacción en este último microtubo. Finalmente, la muestra se seca utilizando una centrifuga al vacío Speed Vaccum de Thermofisher scientific.

Para llevar a cabo la inyección de la muestra al secuenciador se solicitó el servicio al Laboratorio de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM) donde fueron procesados los productos

de reacción con el fin de obtener los electroferogramas correspondientes a cada secuencia purificada. Finalmente el análisis bioinformático se realizó a través de BioEdit, utilizando a su vez la herramienta bioinformática GenBank del NCBI, en la cual se sometieron los alineamientos de las secuencias obtenidas para verificar el gen estudiado.

6. RESULTADOS

Para la obtención de los siguientes resultados, es importante resaltar el uso de las ratas Wistar longevas, de alrededor de 2 años de edad. Dichos roedores una vez que fueron sometidos a eutanasia por parte del departamento de posgrados de la Escuela Superior de Medicina - IPN, se hizo su descripción morfológica del tumor , además del peso de la rata y el tumor.

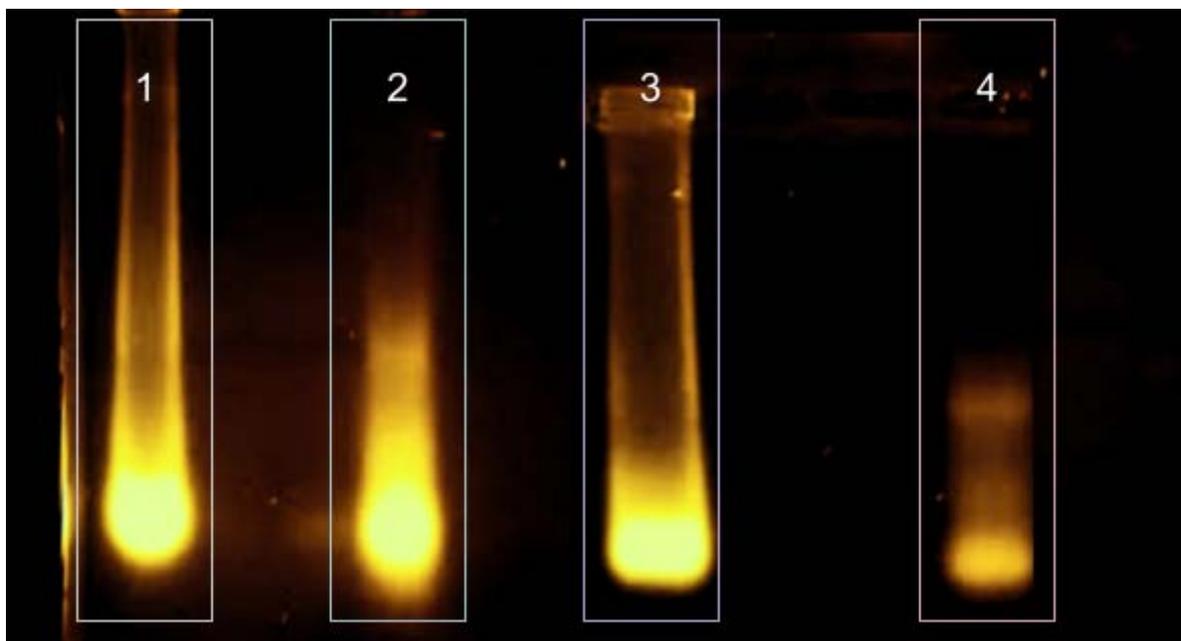
Hecho esto, una parte del tumor fue enviado a un patólogo para su análisis y descripción histológica, esto para agrupar a las muestras de acuerdo al tipo de tejido que presenta cada tumor. Las descripciones de los cuatro grupos de tumores formados (carcinoma, fibrosarcoma, fibroadenoma y fibroquiste) se encuentran de manera detallada en la tabla A1, así como las imágenes de referencia histológica se encuentran en la tabla A2; estas dos tablas se ubican en la sección de anexos al final de este trabajo.

6.1 Electroforesis de RNA

Con el objetivo de corroborar la integridad del RNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.5%. En la figura 5 se observan los resultados obtenidos de este procedimiento, en el cual se emplearon las muestras extraídas sin haber realizado dilución alguna.

Figura 5.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.5% de RNA. Correspondiente a la extracción de RNA.



Nota: En la imagen se observan 4 diferentes carriles resultado del RNA, correspondientes a cada una de las muestras, en orden de izquierda a derecha se visualiza la muestra de carcinoma (1), fibrosarcoma (2), fibrosis quística (3), y fibroadenoma (4). En la imagen se puede observar la presencia del RNA y su integridad, lo que nos ayuda a evaluar si la extracción realizada fue correcta.

6.2 Espectrofotometría de RNA

Para obtener datos sobre la pureza de nuestro material genético extraído, se decidió realizar un espectrofotometría 260/280 nm, en EPOCH. Los resultados obtenidos fueron favorables, reflejados en la tabla 5.

Tabla 5. <i>Espectrofotometría en EPOCH de RNA correspondiente a muestras extraídas.</i>			
Muestra	Grupo	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280
1	Fibrosarcoma	145.9	1.71
2	Carcinoma	764.7	1.838
3		733.1	1.859
4		776.1	1.852
5	Fibroadenoma	151.2	1.845
6		331.4	1.841
7	Fibroquistes	127	1.839
8		293	1.846
9		210.4	1.825
10		252.2	1.815

Como ya mencionamos y como se establece en la tabla anterior, cada una de las muestras obtenidas registra datos favorables que nos permiten ocupar dicho material genético para las siguientes etapas

6.3 Estandarización de oligonucleótidos

En este punto de la investigación se obtuvieron gráficas referentes a la análisis de disociación de los genes que fueron amplificados, para esto obtuvimos un curva las cuales observan en las imágenes de la tabla 6.

Las gráficas muestran una curva en donde el pico más grande hace referencia a la concentración en la cual hay una mayor eficiencia de los oligonucleótidos; para cada uno de los genes se muestra el ciclo en el cual se obtiene el producto deseado. Así mismo se observa el caso en el que los oligonucleótidos no son funcionales dado a que generan dímeros o en los que no hay un producto de reacción, incluso se observa como pueden generarse otros productos de reacción en una baja cantidad pero a una concentración específica, la cual es descartada.

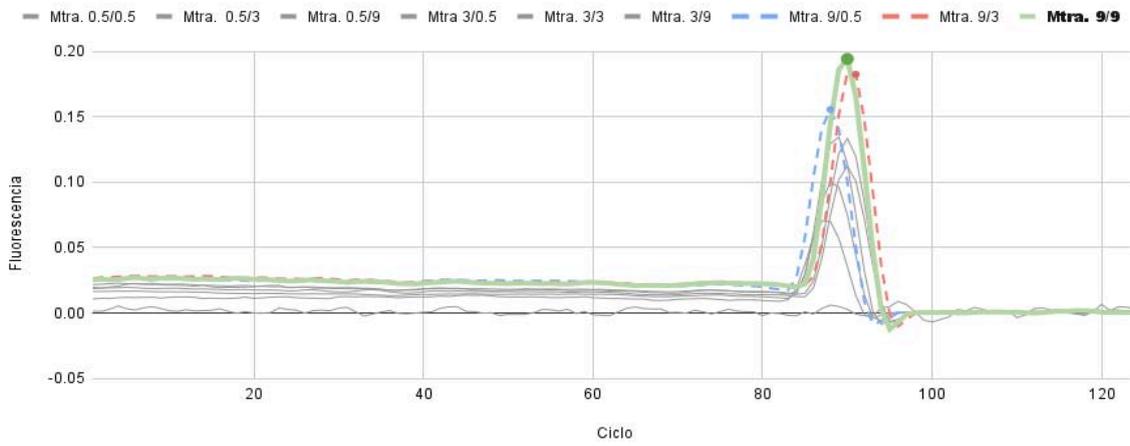
En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos de la estandarización de los oligonucleótidos, así como el Ct en el cual se genera el producto de reacción y la temperatura a la que este se genera.

Tabla 6.

Gráficas de Análisis de disociación para estandarización de oligonucleótidos.

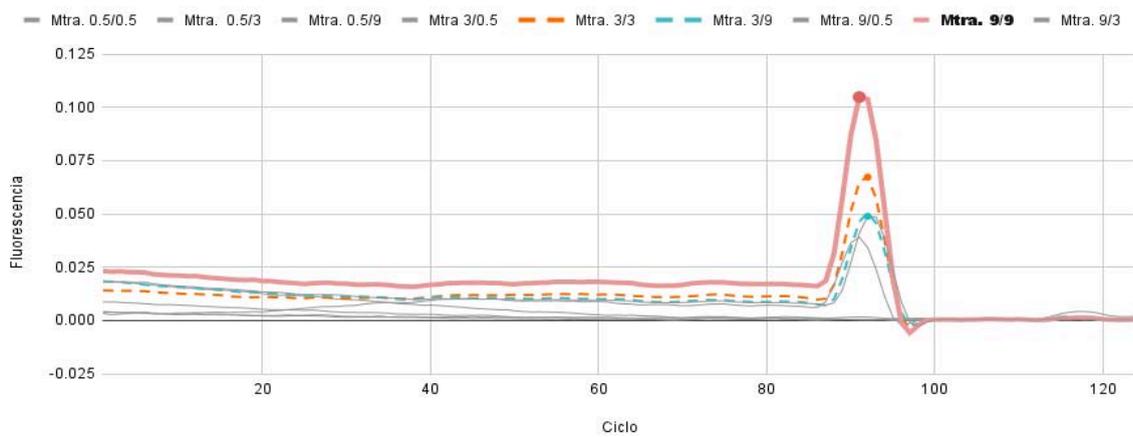
Hk1

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de Hk1.



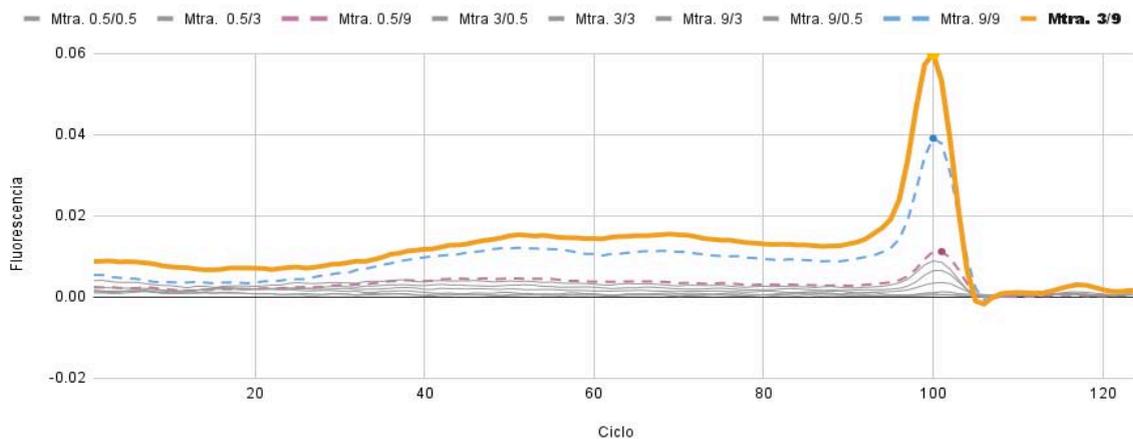
Hk2

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de Hk2.



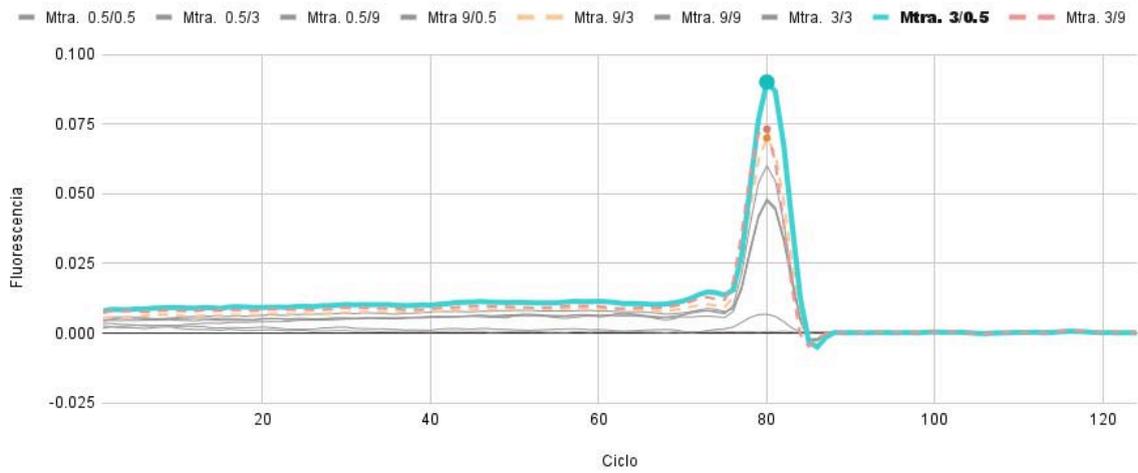
Hk3

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de Hk3.



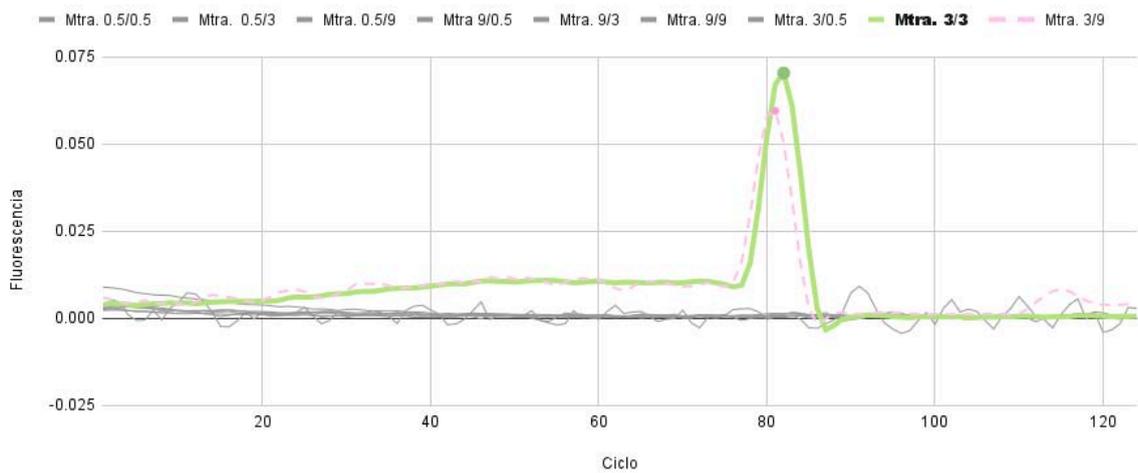
Kcna1

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de Kcna1.



Kcna3

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de Kcna3.



18s rRNA

Gráfica de estandarización de oligonucleótidos de 18s rRNA.

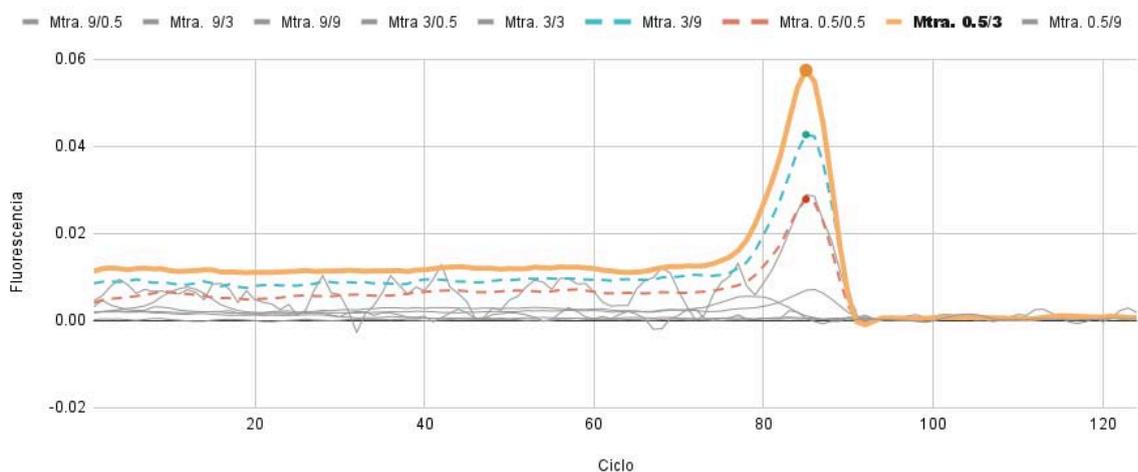


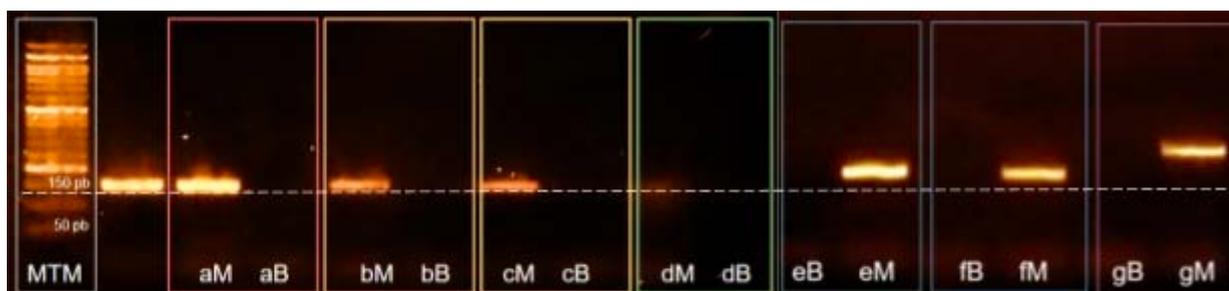
Tabla 7. <i>Concentración de oligonucleótidos en estandarización</i>				
Gen	Forward	Reverse	Ct	Temperatura
18s rRNA	0.5	3	24	81.4
Hk1	9	9	22	77.8
Hk2	9	9	22	76.9
Hk3	3	9	26	81.4
Kcna1	3	0.5	37	77
Kcna3	3	3	23	77

6.4 Amplificación de fragmentos por qPCR

Se realizó la electroforesis de la qPCR realizada para la amplificación de los fragmentos dado que se necesitaba verificar que correspondiera a la amplitud de pares de bases para la que se habían diseñado, los oligonucleótidos, dejando en claro que el diseño realizado fue de 150 pb. Para dicha comprobación se empleó el marcador de tamaño molecular otorgado por el laboratorio que correspondía a 50 pb. En la siguiente figura 6 se muestra el resultado de la electroforesis realizada.

Figura 6.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Corresponde a la prueba de amplificación de los fragmentos con los oligonucleótidos diseñados para 150 pb.



Nota. En el primer carril se muestra el marcador de tamaño molecular (MTM) con un tamaño de 50 bp, el cual se ha resaltado con un recuadro blanco; dicho marcador en la tercera franja muestra un tamaño de 150 pb, lo cual se marca con una línea punteada para mejor percepción. Por otra parte se muestra el resultado de la amplificación correspondiente a los oligonucleótidos empleados (M) y su blanco de muestra (B) para comprobar que no se hayan generado dímeros de un tamaño importante o que se pueda confundir con el producto verdadero. En el caso de las hexoquinasa se han agrupado de la siguiente manera: Hk1 (a), Hk2 (b), Hk3 (c); para la subunidad ribosomal 18s rRNA (d); los canales iónicos se distinguen como Kcna1 (e), Kcna3 (f). Se realizó una prueba del gen Her2 (g), sin embargo debido a que el producto correspondía a mayor pares de bases a las que fue diseñado se descartó.

6.5 Análisis de disociación de genes amplificados

Correspondiente a los resultados obtenidos se registraron en la tabla A3 ubicado en la sección de anexos, en la cual se encuentran los valores de Ct y el Δ Ct de cada gen según el grupo; por otra parte el procedimiento seguido para el método de Livak

se reporta en las tablas A4.1 y A4.2 ubicadas también en la sección de anexos. De dichas tablas se obtuvieron porcentajes de acuerdo a su expresión en cada uno de los grupos y se muestran en la tabla 8, al igual que se pasaron esos porcentajes a las gráficas 1-6 respecto al análisis de la expresión de cada uno de los genes y grupos de tumores.

Tabla 8. <i>Porcentajes de expresión en las muestras</i>					
Muestra	Hk1	Hk2	18sRNA	Kcna1	Kcna3
Control	16,6464	17,8412	19,1482	14,9541	31,4098
Carcinoma	34,8792	15,8268	15,8268	17,6402	15,8268
Fibrosarcoma	26,0182	28,5902	11,9542	13,6369	19,8003
Fibroadenoma	10,3911	9,9265	9,0711	10,0094	60,6017
Fibroquiste	14,6294	17,1578	29,4623	22,8079	15,9424

Gráfica 1.
Expresión génica en porcentajes del grupo control.



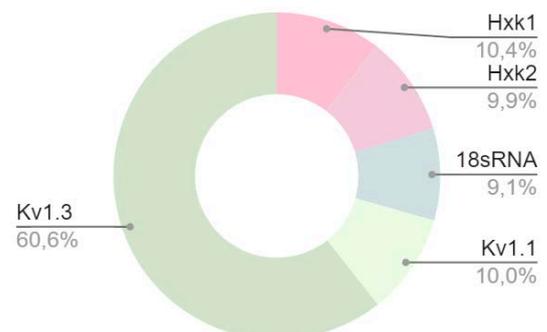
Gráfica 2.
Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor carcinoma



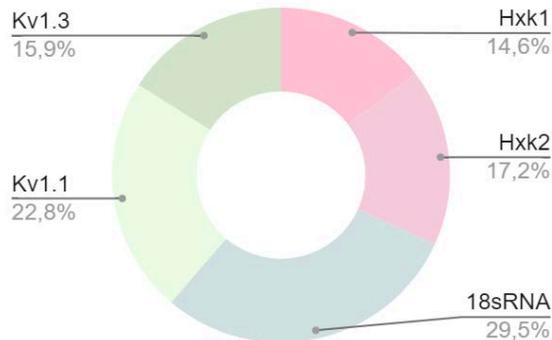
Gráfica 3.
Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibrosarcoma



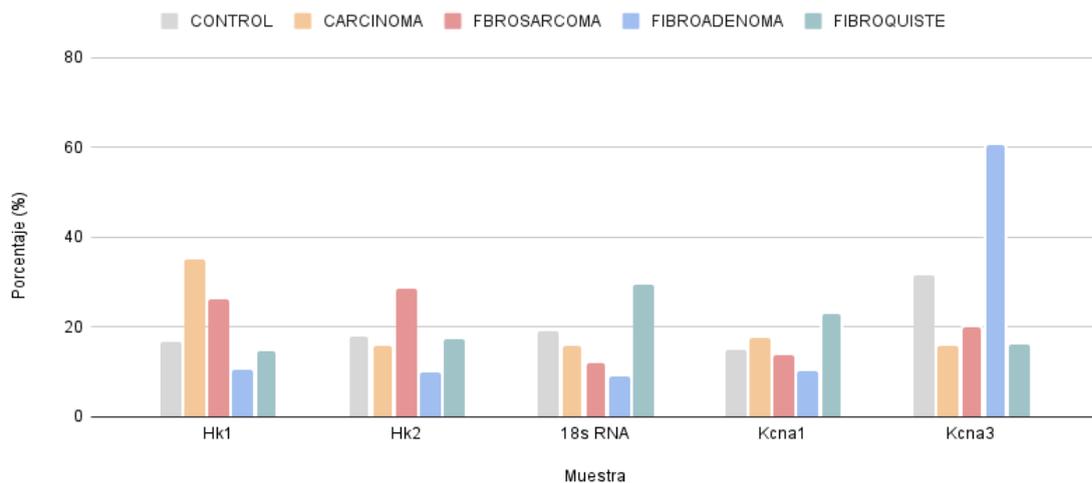
Gráfica 4.
Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibroadenoma



Gráfica 5.
Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibroquistes



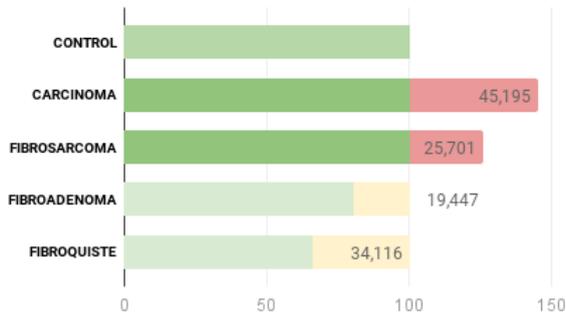
Gráfica 6.
Análisis de cada gen de acuerdo al grupo correspondiente al tipo de tumores.



Posteriormente se realizó un análisis con respecto al grupo control, esto para observar qué tan sobreexpresado se encuentra un gen de cierto grupo comparado con la expresión en el grupo control, de esta misma forma se observa si hay una menor expresión. Los resultados obtenidos se reflejan en las gráficas 7-11, que respaldan a las gráficas previas. Al grupo control se muestra como el 100% de la expresión de cada gen, mientras que en los demás grupos se aumenta o reduce el porcentaje correspondiente a la expresión que presentó en el estudio realizado.

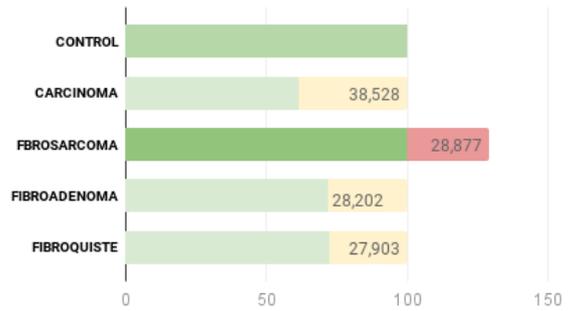
Gráfica 7.

Porcentaje de expresión del gen Hk1 en relación con el grupo control



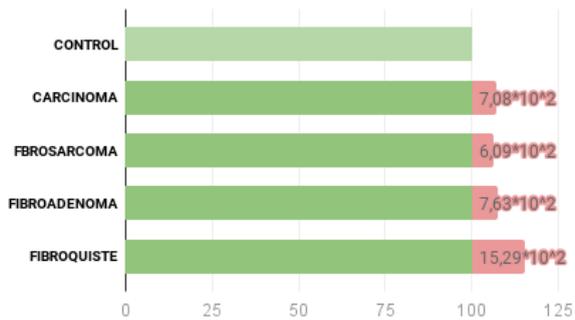
Gráfica 8.

Porcentaje de expresión del gen Hk2 en relación con el grupo control



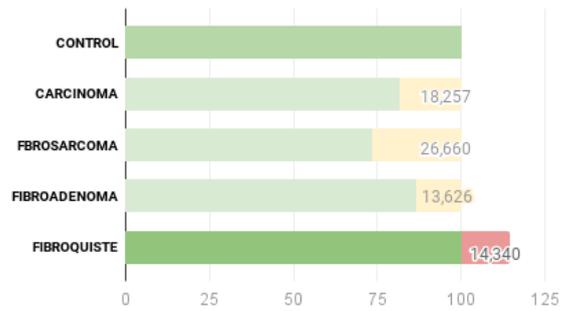
Gráfica 9.

Porcentaje de expresión del gen 18s rRNA en relación con el grupo control



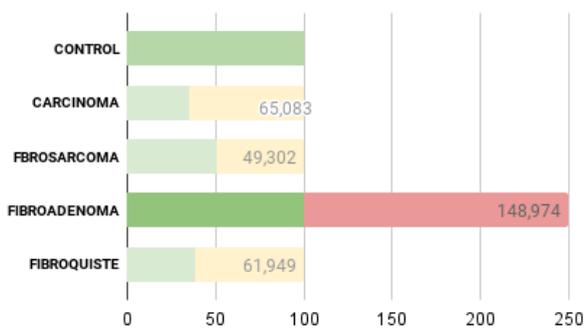
Gráfica 10.

Porcentaje de expresión del gen Kcna1 en relación con el grupo control



Gráfica 11.

Porcentaje de expresión del gen Kcna3 en relación con el grupo control

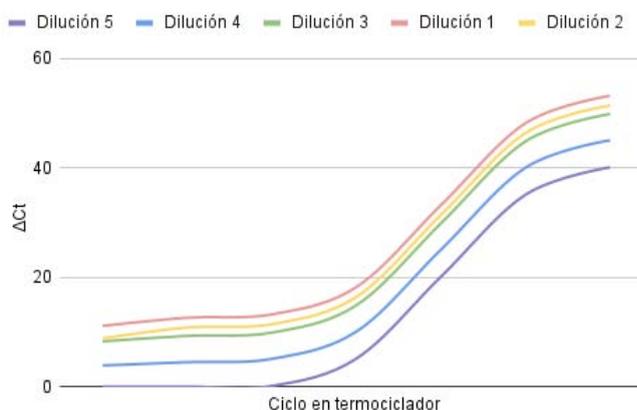


6.6 Validación de reacciones de qPCR

Siguiendo el método de diluciones seriadas se obtuvieron los datos para realizar una regresión lineal de acuerdo a los datos de los Ct de de cada una de las diluciones realizadas y los ciclos en el termociclador. De primera instancia se obtuvo la gráfica 12 que muestra el resultado de la amplificación, la curva que se obtiene en el programa del termociclador.

Gráfica 12.

Representación de amplificación de las diluciones seriadas.



Gráfica 13.

Análisis de reproducibilidad por regresión lineal.



Por otra parte para justificar dichos resultados y verificar que sean correctos, se realizó una validación por el método de diluciones seriadas, donde se obtuvo la gráfica 13, en la cual se observa claramente una línea de tendencia favorable, además de que el cambio entre cada uno de los Ct obtenidos entre cada dilución varía entre 5 valores, lo cual corresponde al método empleado. Además de esto en la tabla A5 se muestran los valores de A y B correspondientes a la regresión lineal. El valor de b es de 18.7 que indica el punto de origen de la recta, y el valor de a que corresponde a la variación que pueden tener los valores es de 3.074 lo cual nos

indica un muy buen valor dado que nuestra gráfica es confiable y por tanto las reacciones realizadas también. Esto indica que el proceso que estamos llevando a cabo otorga resultados confiables y certeros sobre la amplificación de los genes.

6.7 Secuenciación de Sanger

Para verificar que los datos obtenidos sean de total confianza, se prosiguió a realizar una secuenciación mediante la reacción de Sanger y los resultados obtenidos reflejan la cantidad de nucleótidos y la secuencia de estos que se puede verificar en una base de datos para corroborar que el amplicón generado corresponde al gen que se está empleando para la qPCR. Debido a la complejidad y costo de la reacción se ha decidido únicamente realizar los genes Hk1 y Hk3 como referencia, los resultados se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9.
Resultados de secuenciación del gen Hk1.

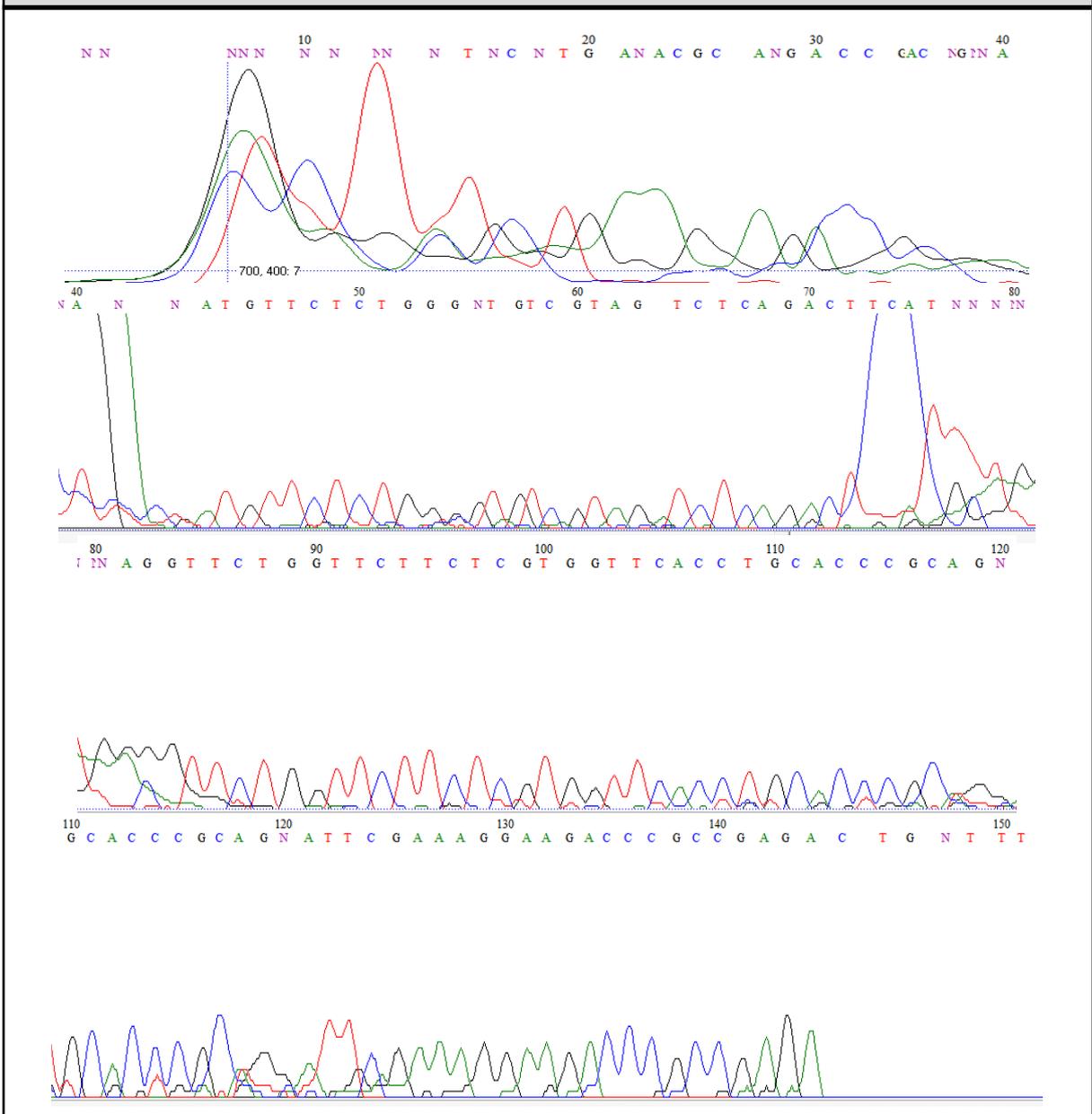
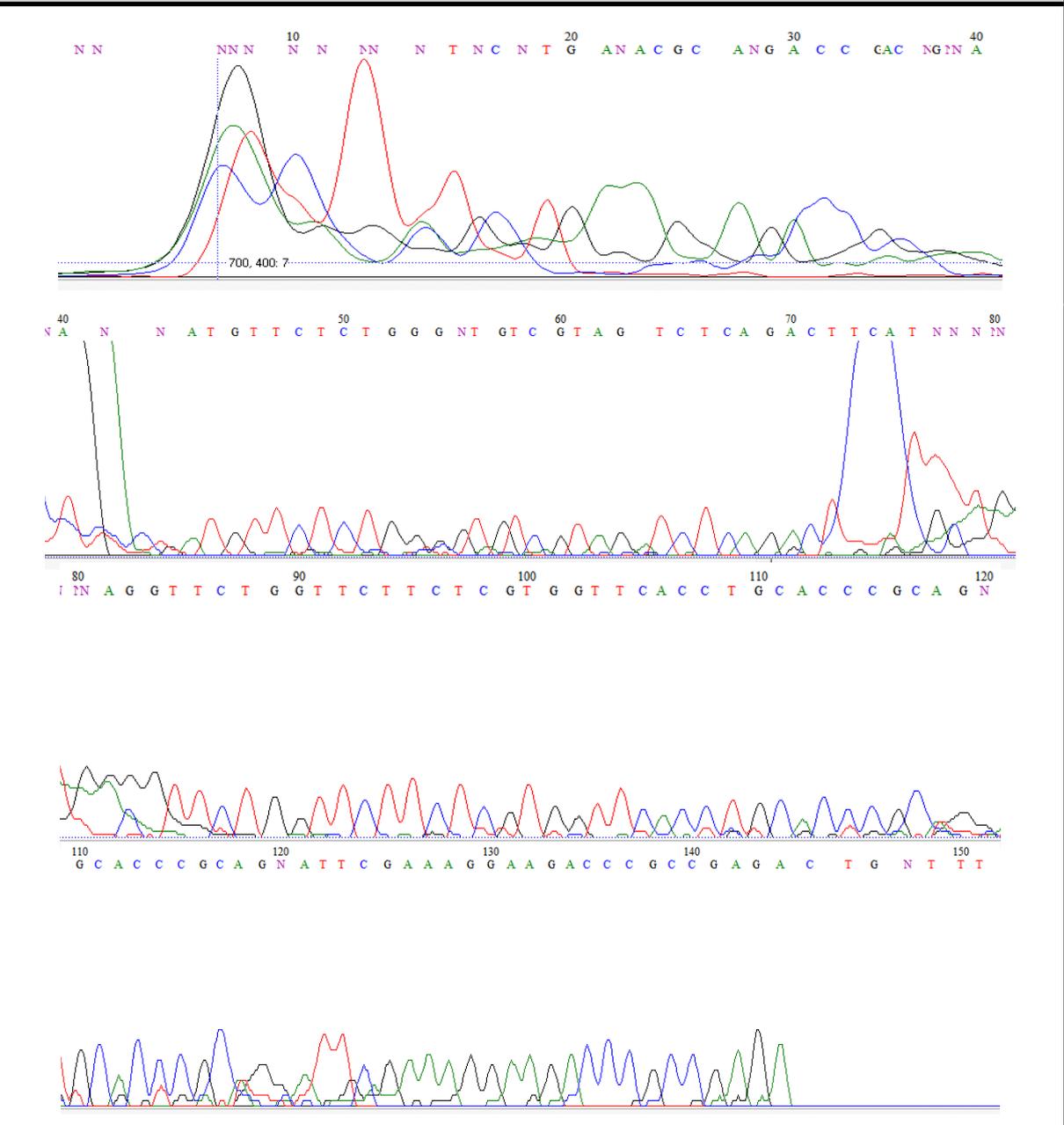


Tabla 10.
Resultados de secuenciación del gen Hk3.



7. DISCUSIÓN

El estudio y análisis de los tumores espontáneos en mama es una parte fundamental para conocer el proceso y futuros tratamientos de los tumores, es crucial conocer la forma en la que se desarrollan y funcionan este tipo de patologías dado que en la actualidad son una de las afecciones más comunes en la población (Shepel & Gould, 1999; Blackshear, 2001; Torre, et al, 2015). Hablando de la mama, los tumores son una de las principales afecciones en las mujeres y mucho más si se habla de cáncer de mama, para el cual se han dedicado años para su conocimiento y entendimiento (Torre, et al, 2015). El uso de ratas como modelo animal para comprender a los tumores mamarios es de gran importancia a nivel de investigación debido a que permite experimentar y ver los posibles casos en los cuales se generan o cómo actúan metabólicamente este tipo de malformaciones (Bomhard & Rinke, 1994; Abbott, 2004).

En el presente estudio, se analizaron los niveles de expresión de los genes Hk1, Hk2, Kcna1, Kcna3 y 18s rRNA, en cuatro tipos de tumores mamarios de ratas: carcinoma, fibrosarcoma, fibroquistes y fibroadenoma. La investigación se llevó a cabo utilizando la técnica de qPCR y se recopilaron datos de expresión génica de un total de 10 muestras de tumores. A continuación, se presenta un análisis detallado de los resultados, enfocándose en las diferencias de expresión de los genes hexoquinas entre los distintos fenotipos tumorales y su posible relación con la agresividad tumoral.

De primera instancia una vez clasificados los tumores de acuerdo con su histología, se prosiguió a realizar la extracción del material genético, en nuestro caso el RNA debido que el objetivo es realizar una síntesis de cDNA. En la extracción de RNA es importante verificar mediante la electroforesis que se haya realizado de manera correcta y que efectivamente se encuentre material genético de nuestro interés; como se detalló en la figura 5; el carril número 4 contiene bandas de RNA correspondientes al 18s y 28s rRNA, en el carril 2 se distingue una banda correspondiente a 28s; por otra parte las bandas restantes tienen menor definición, esto debido a que el material genético puede tener contaminación y requiere purificación. Sin embargo gracias a que ya se extrajo el RNA se procedió a realizar una espectrofotometría de este en EPOCH, el cual a una relación 260/280 nm de longitud de onda permite conocer la concentración en ng/μl y la pureza de nuestro material genético.

Como se observa en la tabla 5, la concentración mayor de RNA se localiza en el grupo del carcinoma, mientras que los demás se encuentran en un rango de 130 a 280 ng/μl, lo cual es favorable ya que se busca llegar a una concentración de 500 ng/μl en cada pool por grupo de tumores. Dichas concentraciones fueron adecuadas para colocar la misma cantidad de muestra en cada grupo para evitar futuros errores debido a la diferencia de concentración.

Por otro lado tenemos la relación de absorción a 260/280 nm donde la mayoría de las muestras van de 1.82 a 1.84 lo cual es bastante bueno debido a que esa relación

debe de encontrarse en un rango de 1.8 a 2 para descartar la presencia de proteínas y únicamente contar con material genético de interés que es el RNA. Por su parte el fibrosarcoma que contiene una muestra únicamente, tiene una relación de 1.71 pero debido a que únicamente se encuentra una muestra y no es tan baja esa relación se decidió continuar con el uso de esa muestra tal y como se encuentra. Además de esto posterior a la electroforesis y espectrofotometría se realizó la purificación de RNA mediante DNAsas para obtener un material genético completamente puro y listo para la síntesis de cDNA.

A su vez se realizó el diseño de los oligonucleótidos, de los cuales se recopilamos todos los datos detalladamente en la base de datos GenBank del NCBI añadiendo todas las posibles variantes dentro del diseño, esto para no aislar ningún tipo de variante y que se generen oligonucleótidos exclusivos del gen. Una vez que se tuvieron sintetizados y solubilizados los oligonucleótidos, se siguió con la etapa de estandarización en la cual se pretende comprobar que al contrario de la PCR punto final, en una qPCR no es necesario tener las mismas cantidades equimolares de un cebador sentido que uno antisentido, esto debido a que puede generar dímeros, productos no deseados o saturación de un cebador en una reacción.

De dicha estandarización surgieron los resultados presentados en la tabla 7, donde podemos observar que varían las concentraciones del oligonucleótido sentido y el antisentido del mismo gen, como en el caso del gen 18s rRNA o Kcna1 donde la concentración es muy baja y aún así la eficiencia de la reacción no baja, a comparación del gen Hk2 que ocupa una concentración de cebadores más alta. La estandarización además de ayudar a la eficiencia de reacción en todos los sentidos, nos permite tener menos interferencias a la hora de la lectura y una electroforesis más limpia hablando de menor cantidad de oligonucleótidos en la parte inferior de este.

Continuando con el proceso de estandarización se puede observar en la tabla 6, cómo la eficiencia de la reacción no depende de una concentración mayor de cebador, si no que en algunos casos varias concentraciones producen el amplicón deseado pero la cantidad de material genético amplificado no da la señal más adecuada, o hay casos que por el contrario no generan el producto que se requiere. Como ejemplo de lo anterior tenemos la estandarización del gen Hk2 donde se observa cómo una concentración de cebadores predomina entre las demás, mostrando una mejor eficiencia de la reacción. En el caso de Hk1 podemos observar que todos los cebadores producen un producto de reacción sin embargo gracias al diseño de los oligonucleótidos podemos conocer la temperatura a la que estos se generan, por lo que conocemos cual es el producto verdadero y de esta manera se descartaron las otras posibilidades de amplificación en las cuales no tenemos el producto que necesitamos. En el caso del gen Kcna3 que posee solo dos opciones de concentraciones de cebadores dado que las otras no producen un producto, en ese caso se eligió la que presentó una mejor eficiencia; o por último el caso del 18s rRNA que tiene concentraciones que producen el amplicón que se necesita, sin embargo, también generan interferencias que se reflejan en las lecturas del Ct por lo que deben descartarse para el análisis de la expresión génica que se realizará posteriormente.

Para corroborar que efectivamente se amplifica el producto deseado se procedió a realizar una electroforesis con un marcador de tamaño molecular de 50 pb, esto debido a que los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar un fragmento de 150 pb, lo que indica que en la electroforesis se espera una banda en la tercera franja con respecto al marcador. Los resultados se reflejan en la figura 6, en la cual todos los amplicones corresponden a esto, a excepción del 18s rRNA, debido a que este no fue diseñado bajo los mismos criterios que los demás y se desconocía la cantidad de pares de bases a la cual fue diseñado, sin embargo con la estandarización y la electroforesis se tiene una mayor información sobre el par de oligonucleótidos y su amplicón para reacciones posteriores.

Una vez que se prepararon las muestras y los cebadores, se prosiguió con la amplificación de los genes mediante qPCR para la cual se obtuvieron los resultados referentes a la expresión génica estipulados en la tabla A3. Los resultados fueron evaluados de acuerdo al método de Livak, o sea el método $2^{(-\Delta Ct)}$, cuyo procedimiento se encuentra detallado en la sección de anexos en las tablas A4.1 y A4.2. El método consta en obtener el ΔCt de cada grupo estudiado, es decir la media de todos los ensayos realizados, en este caso se optó por un total de 5 ensayos para cada una de las muestras, teniendo un total de 25 ensayos por gen estudiado, posteriormente se restó el ΔCt correspondiente al gen endógeno elegido (Hk3), para así eliminar cualquier error de lectura que pudiera haberse generado en las reacciones efectuadas.

Para una mejor manipulación los datos correspondientes a la expresión de cada uno de los genes por grupo, se trataron mediante porcentajes que se encuentran en la tabla 8, los cuales se trasladaron a gráficas para un mejor entendimiento.

De primera instancia tenemos al grupo control en la gráfica 1, que nos muestra la referencia de la expresión de un tejido sin tumores, aunque en las gráficas 7-11 se observa una mejor comparación entre el grupo control y los grupos de tumores.

Derivado de los experimentos realizados se obtuvieron 4 perfiles diferentes característicos de cada tipo de tumor estudiado. Los tumores malignos presentan una sobreexpresión de enzimas glucolíticas, mientras que los tumores benignos como el fibroadenoma y el fibroquiste se caracterizan por tener una mayor expresión de genes de canales de potasio. Lo anterior se puede observar en las gráficas 2-5, en las cuales analizando cada una a detalle se puede destacar lo siguiente:

- I. Carcinoma: en la gráfica 2 se observa un predominio del gen Hk1, seguido por una expresión de menor cantidad del canal de potasio Kv1.1; por último la expresión de genes en este tumor concluye con la misma magnitud en los genes Hk2, Kcna3 y 18s rRNA. Lo que sugiere que hay una mayor actividad glucolítica y proliferación celular.
- II. Fibrosarcoma: tratándose del tipo de tumor más agresivo, predomina en expresión de hexoquinasas, es decir tiene un mayor requerimiento metabólico, incluso más que el carcinoma, presentando ligeramente una mayor expresión de Hk2 a comparación de Hk1. Posteriormente se tiene la expresión de canales iónicos encabezado por el Kcna3 y seguido del Kcna1

lo cual indica que también hay una proliferación celular, y por último una baja expresión de 18s rRNA.

- III. Fibroadenoma: un tumor de tipo benigno pero el más frecuente es el reflejado en la expresión de la gráfica 4, predomina por más del 60% gen Kcna3, dominante en proliferación celular en tejidos grasos, los demás genes se encuentran relativamente iguales; referente a las hexoquinasas no se muestra como un tumor de requerimiento glucolítico.
- IV. Fibroquiste: por último se encuentra otro tumor benigno, en el cual sobresale la expresión de 18s rRNA, en segundo lugar se encuentra el Kv1.1, seguido de una actividad glucolítica expresada con el gen Hk2, y posteriormente el gen Kcna3, y en último lugar la hexoquinasa 1. Lo cual sugiere que después de la expresión de proteínas hay una actividad de proliferación celular que corresponde a este tumor.

Además del análisis individual sobre el nivel de expresión de los genes en cada uno de los tumores, se decidió observar mediante la gráfica 6 cuáles son los grupos que predominan según cada gen.

- A. Hk1: la expresión de este gen predomina en los tumores cancerígenos, esto corresponde al análisis pasado de los genes, donde tanto como el fibrosarcoma y el carcinoma son los principales tumores con actividad glucolítica, sin embargo el carcinoma es el grupo de tumores en el cual predomina la expresión de este gen.
- B. Hk2: se observa una expresión semejante entre el grupo control, carcinoma y los fibroquistes; sin embargo el grupo de tumor que presenta una mayor expresión de este gen es el fibrosarcoma, tratándose del tumor más agresivo y este siendo de alto requerimiento metabólico, además de esto se destaca que el grupo de menor actividad corresponde al fibroadenoma, siendo un tumor de tipo benigno.
- C. 18s rRNA: siendo un gen responsable de la síntesis proteica, es encabezado por el tumor de tipo fibroquiste que presenta un tipo de tejido rico en proteínas, posterior a esto se observa un descenso de la actividad con referencia al grupo control en el resto de los tumores.
- D. Kcna1: es el gen de menor actividad comparado con el resto, sin embargo presenta una expresión predominante en el fibroquiste, siendo este un tumor con bastante proliferación celular; por otra parte, en el resto de los tumores hay otros genes que predominan o se distinguen en estos.
- E. Kcna3: con una expresión por encima del doble de la expresión del grupo control, se encuentra el tumor de tipo fibroadenoma, es decir que es el grupo más distinguido en este gen, y el resto de los grupos tumorales tienen su expresión por debajo del grupo control.

En este análisis detallado de cada una de las gráficas obtenidas se destaca que las hexoquinasas son fundamentales, ya que participan en el metabolismo glucolítico, en un tejido normal podemos encontrar Hk1 debido al requerimiento energético propio de la célula, mientras que Hk2 se refiere a tejidos lipídicos; en contraste una

sobreexpresión de Hk1 como en el caso de un carcinoma no solo se deriva de un requerimiento energético si no que se ha relacionado con resistencia a la apoptosis; lo que se puede observar también en el grupo de fibrosarcoma donde además de Hk1 se presenta sobreexpresión la Hk2 debido al extremo requerimiento de energía en esa línea tumoral.

Los canales de potasio sobreexpresados son resultado de hiperproliferación celular en los tumores principalmente correspondientes a fibroadenomas y fibroquistes, aunque este último destaca por una sobreexpresión de la subunidad ribosomal 18s rRNA dado a la elevada síntesis proteica que se distingue en este tipo de tumor.

Las gráficas 7-11 representan la diferencia entre la expresión de los grupos de tumores en referencia al grupo control. De primera instancia se observa que la Hk1 tiene mayor expresión en los grupos cancerígenos (carcinoma y fibrosarcoma), tal y como se espera debido a su requerimiento glucolítico, mismo que se ve reflejado en la Hk2 la cual tiene un 30% de mayor expresión en el fibrosarcoma, corroborando lo establecido en el efecto Warburg con respecto a que la Hk2 es la empleada en los procesos cancerígenos. Hablando de los canales de potasio, se ve una mayor expresión en los grupos de tumores benignos (fibroadenoma y fibroquiste); en el caso de la expresión de Kcna1 se ve mayormente expresado el fibroquiste, mientras que el canal Kv1.3 es sobreexpresado en el fibroadenoma en casi 150% más que el grupo control. Por último la expresión del 18s rRNA es mayor en todos los grupos de tumores, pero incrementa en el grupo de fibroquiste, justo por la cantidad de proteína que este llega a generar.

Diferentes estudios sobre el cáncer de mama en modelos murinos han resaltado que las hexoquinasa tienen un papel importante en tumores cancerígenos; en este caso trabajando con carcinoma y otro tipo más agresivo y menos frecuente como el fibrosarcoma se ha comprobado este papel en la literatura, observando que presentan una actividad glucolítica mayor las células de estos tipos de tumores dado a su alta expresión de genes como Hk1 y Hk2 (Katabi, 1999; Tan & Miyamoto, 2015; Li et al, 2022). Esto lo respalda Warburg que expresa que la glucólisis de tipo aeróbica es un sello distintivo en células de tipo cancerígeno, esto reflejado en una sobreexpresión de enzimas glucolíticas unido a una actividad mejorada de estas. La hexoquinasa es la principal enzima en la vía de glucólisis aeróbica, debido a que cataliza la fosforilación de glucosa por adenosina trifosfato (ATP) a G6P, la mayoría de las células tumorales producen cantidades sustanciales de energía a través de un alto metabolismo glicolítico (Wu et al, 2020; Li et al, 2022). Entre ambas enzimas, la Hk2 juega un papel importante no sólo en la glucólisis sino también en la supervivencia celular, por ende es razonable que una mayor expresión de este gen se vea reflejado en una mayor resistencia y agresividad cancerígena como es el caso del fibrosarcoma, mientras que una menor supervivencia celular puede ser correspondida en la Hk1 como en el caso del carcinoma (Bhowmick et al, 2004; Hanahan & Weinberg, 2011; Gandhi & Das, 2019).

Por otra parte, los canales iónicos de potasio (K⁺) contribuyen a la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, y también son involucrados en la generación de

tumores. La expresión baja en tumores cancerígenos se ha estudiado debido a su función en la apoptosis celular, esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en el presente estudio, contrastando con los niveles de expresión observados en los tumores benignos como el fibroadenoma y los fibroquistes, el primero de estos presenta una alta expresión de canales iónicos, debido a que es el tumor más frecuente en modelos murinos y en humanos, contrastando con la expresión de un fibroquiste que si tiene una alta expresión de canales de potasio, sin embargo, se encabeza por la expresión de la unidad ribosomal 18s debido a su tipo de tejido (Marxfeld et al, 2006; Brevet et al, 2008).

Un procedimiento adicional que se decidió realizar fue una reacción de secuenciación por el método de Sanger, esto debido a que se quiso verificar de todas las maneras posibles que las reacciones efectuadas fueron de suma confianza durante todo el proceso, es por ello que se obtuvieron las imágenes asentadas en la tabla 9, las cuales muestran las gráficas de la secuenciación realizada, posteriormente se analizaron las secuencias por la base de datos BLASTn del NCBI y se comprobó que efectivamente corresponden a los genes de interés. Sobre todo se enfocó este análisis en el gen endógeno dado que este regula todos los demás resultados de Ct de los genes analizados.

Todo esto fue realizado para obtener reacciones con una relación de calidad y efectividad, en las cuales los resultados obtenidos se verificaban y analizadas mediante los métodos necesarios para que de esta forma podamos dar fé de que lo establecido en este trabajo es de suma confianza y verificado.

8. CONCLUSIONES

El cáncer de mama es un grave problema de salud global debido a su alta aparición e impacto en las mujeres. En este estudio se planteó un perfil de expresión basado en los genes Hkl, Hkll, Kcna1, Kcna3 y 18s rRNA , en referencia a la actividad glucolítica, proliferación celular y tipo de tejido que presentan diferentes tipos de tumores mamarios cancerígenos y benignos. Gracias a la estandarización y diseño de oligonucleótidos se pudieron amplificar las muestras mediante qPCR y hacerse un análisis por método de Livak y obtener gráficas que nos indican qué tipo de gen aumenta la expresión según el tejido tumoral que se esté analizando.

Se comprueba que la sobreexpresión de hexoquinasas se da en tejidos con actividad cancerígena, mientras que la expresión de genes relacionados a canales de potasio aumenta en tejidos con mayor proliferación celular, como en tumores benignos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, A. (2004) The Renaissance rat. *Nature* 428, 464–466 .
<https://doi.org/10.1038/428464a>
2. Abraham, M. R., Jahangir, A., Alekseev, A. E., & Terzic, A. (1999). Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *The FASEB Journal*, 13(14), 1901–1910. [doi:10.1096/fasebj.13.14.1901](https://doi.org/10.1096/fasebj.13.14.1901)
3. Alvarado, C., Granados, V. (2010). Fibrosarcoma de la glándula mamaria. *Patol Rev Latinoam*; 48(3):208-211
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell: Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes*. 4ª edición. Nueva York: Garland Science. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21052/>
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; From RNA to Protein. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/>
6. Alessio HM, Schweitz NB, Snedden AM, Callahan P, Hagerman A. (2009) Revisiting influence on tumor development focusing on laboratory housing. *J. Am Assoc Lab Anim Sci*; 48: 258-262.
7. Animal Welfare Information Center (AWIC). (2021). Animal Welfare Information Center - Rats and Mice (*Rattus norvegicus* and *Mus musculus*).
8. Arceo Martínez, M., López Meza, J., Ochoa Zarzosa, A., & Palomera Sanchez, Z. (2021). Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. *Gaceta mexicana de oncología*, 20(3), 101-110.
<https://doi.org/10.24875/j.gamo.21000134>
9. Bhowmick, N., Neilson, E. & Moses, H. (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337 .
<https://doi.org/10.1038/nature03096>
10. Blackshear, P. E. (2001). Genetically Engineered Rodent Models of Mammary Gland Carcinogenesis: An Overview. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 105–116.
<https://doi.org/10.1080/019262301301418919>
11. Bomhard, E., & Rinke, M. (1994). Frequency of spontaneous tumors in Wistar rats in 2-year studies. *Experimental and Toxicologic Pathology*.
[https://doi.org/10.1016/s0940-2993\(11\)80007-2](https://doi.org/10.1016/s0940-2993(11)80007-2)
12. Brevet M, Ahidouch A, Sevestre H, Merviel P, El Hiani Y, Robbe M, Ouadid-Ahidouch H. (2008) Expression of K⁺ channels in normal and cancerous human breast. *Histol Histopathol*. [doi: 10.14670/HH-23.965](https://doi.org/10.14670/HH-23.965). PMID: 18498071.
13. Brown, R. S., Goodman, T. M., Zasadny, K. R., Greenson, J. K., & Wahl, R. L. (2002). Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nuclear Medicine and Biology*, 29(4), 443–453.
[doi:10.1016/s0969-8051\(02\)00288-3](https://doi.org/10.1016/s0969-8051(02)00288-3)
14. Brown TA. (2002) *Genomes*. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; Chapter 10, Synthesis and Processing of RNA. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21132/>
15. Calero Cuerda, F. (1999) Factores de riesgo en el cáncer de mama. Elsevier, 42(90), 9065-9088

16. Ciscato, F., Ferrone, L., Masgras, I., Laquatra, C., & Rasola, A. (2021). Hexokinase 2 in Cancer: A Prima Donna Playing Multiple Characters. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4716. doi:10.3390/ijms22094716
17. Cooper GM. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Translation of mRNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/>
18. Corredor Andrés, B., Márquez Rivera, M., Lobo Bailón, F., González Meli, B., Azorín Cuadrillero, D., Muñoz Calvo, M. T., & Argente, J. (2018). Fibroadenoma gigante de mama en adolescentes: procedimientos diagnóstico-terapéuticos. *Anales de Pediatría*. doi:10.1016/j.anpedi.2018.01.006
19. Cossio Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Hochmuller Fogaça, R., & Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659>
20. Fernández T, Ángel, & Reigosa Y, Aldo. (2015). Riesgo de cáncer de mama en mujeres con patología mamaria benigna. *Comunidad y Salud*, 13(1), 78-86. Recuperado en 01 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-32932015000100011&lng=es&tIng=es.
21. Ferrer Montiel, A. (2015). Puesta a punto de la plataforma de patch clamp automático IonFlux para realizar cribados de alto rendimiento en Kv1.1 [Tesis para el grado de Biotecnología, Universidad Miguel Hernandez De Elche].
22. Galbarro Muñoz, J. (1991). Tumorigenesis experimental en la mama de la rata Wistar. [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla, Sevilla.
23. Gallo Vallejo, J. L., Mas Masats, M. P., Vico Zúñiga, I., & Aibar Villán, L. (2013). Mastopatía fibroquística. Aspectos controvertidos. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 40(6), 269–276. doi:10.1016/j.gine.2013.02.006
24. Ganapathy Kanniappan, S. (2017). Taming Tumor Glycolysis and Potential Implications for Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 7. doi:10.3389/fonc.2017.00036
25. Gandhi, N., & Das, G. M. (2019). Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells*, 8(2), 89. <https://doi.org/10.3390/cells8020089>
26. Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5), 449–462. doi:10.1093/bib/bbr042
27. Gava, R., Corte, M., Vizoso, F., Rodríguez, J. C., Vázquez, J., Lamelas, M. L., Sánchez, M. T., Martín, A., Alonso, L., Idelfonso, C., García Muñoz, J. L., & Abad, M.. (2002). Importancia de la edad como factor pronóstico determinante de la variabilidad de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama. *Medifam*, 12(6), 29-40.

28. Gries CL, Young SS. (1982) Positive correlation of body weight with pituitary tumor incidence in rats *Fundam Appl Toxicol*, 2,145-148. [doi:10.1016/s0272-0590\(82\)80096-1](https://doi.org/10.1016/s0272-0590(82)80096-1).
29. Gutman H, Pollock RE, Ross MI, Benjamin RS, Johnston DA, Janjan NA, Romsdahl MM. (1994) Sarcoma of the breast: implications for extent of therapy. The M. D. Anderson experience. *Surgery*; 116(3):505-9. [PMID: 8079181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8079181/).
30. Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T. E., Friedenreich, C. M., Calle, E. E., Gapstur, S. M., Patel, A. V., Coates, R. J., Liff, J. M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Marcou, Y., Kakouri, E., Duffy, S. W., Morabia, A., Schuman, L. M., . . . Magnusson, C. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, 13(11), 1141–1151. [doi:10.1016/s1470-2045\(12\)70425-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(12)70425-4)
31. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
32. Haseman JK and Rao GN. (1992) Effects of corn-oil, time-related changes and inter-laboratory variability on tumor occurrence in control Fisher 344 (F-344/N) rats. *Toxicol Pathol*, 20, 52-60. <https://doi.org/10.1177/019262339202000107>
33. Honvo Houéto, E., & Truchet, S. (2015). Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. *Journal of Visualized Experiments*, 106. [doi:10.3791/53179](https://doi.org/10.3791/53179)
34. Iorio J, Lastraioli L, Arcangeli A. (2022) Potassium in Solid Cancers. In: *Physiology*. IntechOpen. [doi:10.5772/intechopen.101108](https://doi.org/10.5772/intechopen.101108)
35. Irwin, D. M., & Tan, H. (2008). Molecular evolution of the vertebrate hexokinase gene family: Identification of a conserved fifth vertebrate hexokinase gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 3(1), 96–107. [doi:10.1016/j.cbd.2007.11.002](https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.11.002)
36. Ishfaq, M., Bashir, N., Riaz, S. K., Manzoor, S., Khan, J. a. M., Bibi, Y., Sami, R., Aljahani, A. H., Alharthy, S. A., & Shahid, R. (2022b). Expression of HK2, PKM2, and PFKM Is Associated with Metastasis and Late Disease Onset in Breast Cancer Patients. *Genes*, 13(3), 549. <https://doi.org/10.3390/genes13030549>
37. Katabi, M. M., Chan, H. L. W., Karp, S. E., & Batist, G. (1999). Hexokinase Type II: A Novel Tumor-Specific Promoter for Gene-Targeted Therapy Differentially Expressed and Regulated in Human Cancer Cells. *Human Gene Therapy*, 10(2), 155–164. <https://doi.org/10.1089/10430349950018959>
38. Kcna3 potassium voltage-gated channel subfamily A member 3 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29731>
39. Li, R., Mei, S., Ding, Q., Wang, Q., Li, Y., & Zi, F. (2022). A pan-cancer analysis of the role of hexokinase II (HK2) in human tumors. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23598-8>

40. Li, X., Gu, J., & Zhou, Q. (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6(1), 17–24. [doi:10.1111/1759-7714.12148](https://doi.org/10.1111/1759-7714.12148)
41. Maffuz Aziz, A., Labastida Almendaro, S., Espejo- Fonseca, A., & Rodríguez Cuevas, S. (2017). Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cirugía y Cirujanos*, 85(3), 201–207. [doi:10.1016/j.circir.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.08.004)
42. Marco, V., García, F., Rubio, I. T., Soler, T., Ferrazza, L., Roig, I., Mendez, I., Andreu, X., Mínguez, C. G., & Tresserra, F. (2020). Adenoid cystic carcinoma and basaloid carcinoma of the breast: A clinicopathological study. *Revista Española De Patología*. doi.org/10.1016/j.patol.2020.09.005
43. Marzo Castillejo, M., & Vela Vallespín, C. (2018). Sobrediagnóstico en cáncer. Atención Primaria. [doi:10.1016/j.aprim.2018.08.002](https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.08.002)
44. Martínez-Ramos, D., Alcalde-Sánchez, M., Peñas-Pardo, L., & Salvador-Sanchís, J. L. (2009). Los fibroadenomas mamarios también pueden contener lesiones premalignas y malignas. *Cirugía Española*, 86(1), 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2008.07.013>
45. Marxfeld, H., Staedtler, F., & Harleman, J. (2006). Gene expression in fibroadenomas of the rat mammary gland in contrast to spontaneous adenocarcinomas and normal mammary gland. *Experimental and Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.06.007>
46. Mayo Clinic. (2022, October 13). Fibroadenoma - Síntomas y causas <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/fibroadenoma/symptoms-causes/syc-20352752#:~:text=Un%20fibroadenoma%20es%20un%20n%C3%B3dulo,fibroadenoma%20no%20suele%20provocar%20dolor>.
47. McGregor, G. I., Knowling, M. A., & Este, F. A. (1994). Sarcoma and cystosarcoma phyllodes tumors of the breast—A retrospective review of 58 cases. *The American Journal of Surgery*, 167(5), 477–480. [doi:10.1016/0002-9610\(94\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0002-9610(94)90238-0)
48. Miguel Soca P, Argüelles González I, Peña González M. (2016) Factores genéticos en la carcinogénesis mamaria. *Revista Finlay [revista en Internet]*.
49. Milesi, V., Mobili, P., (2019) *Fisiología Celular: Señales Y Respuestas*. Buenos Aires: Edulp
50. Möller Bredo, R., & Vazquez Odo, N. (2011). Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, 29(1), 76-79
51. OPS/OMS (2021). *Cáncer de mama*. | Organización Panamericana De La Salud. <https://www.paho.org/es/temas/cancer-mama>
52. Ramia, J. (2000). Sarcoma estromal de mama. *Cirugía Española*. <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-sarcoma-estromal-mama-10027>
53. Ramos Águila, Y., Marimón Torres, E., Crespo González C., Junco Sena B., & Valiente Morejón W. (2015). Cáncer de mama, su caracterización epidemiológica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 19(4), 619-629.

54. Rgd. (2022). RGD Reference Report - Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. - Rat Genome Database. <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/reference/main.html?id=1004735>
55. Rodríguez, E. P. V., Meléndez, A. a. G., De Jesús Cruz Aguilar, R., & Zelaya, T. E. C. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta*, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
56. Sánchez Alvarez, M., Roque de Escobar M., Hilda D., & Delgado Cura, N. (2020). Detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real en el Laboratorio de Biología Molecular de Villa Clara. *Medicentro Electrónica*, 24(3), 470-475. Epub 01 de julio de 2020. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432020000300470&lng=es&tlng=es.
57. Sengupta P. (2011) A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *Biomed Int*, 2, 81-89. Biomedicine International, Inc.
58. Sharma S, Entian KD. (2022), Chemical Modifications of Ribosomal RNA. In: Entian KD, editor. *Ribosome Biogenesis: Methods and Protocols* [Internet]. New York (NY): Humana; 2022. Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586879/> doi: [10.1007/978-1-0716-2501-9_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9_9)
59. Shepel. A., & Gould, M. K. (1999). The Genetic Components of Susceptibility to Breast Cancer in the Rat. *Progress in Experimental Tumor Research*. <https://doi.org/10.1159/000062012>
60. Subramanian A, Kotharia. L. (1991) Melatonin, a suppressor of spontaneous murine mammary tumors. *J Pineal Res.*, 10, 136-140 <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1991.tb00830.x>
61. Táboas Álvarez, Alba, Martí Álvarez, Covadonga, Sánchez Méndez, José Ignacio, Yébenes Gregorio, Laura, Hardisson Hernández, David, & Hernández Gutiérrez, Alicia. (2019). Fibromatosis mamaria. Reporte de dos casos clínicos y revisión bibliográfica. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 84(5), 384-392. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262019000500384>
62. Tan, V. P., & Miyamoto, S. (2015). HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*, 11(6), 963–964. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1042195>
63. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
64. Vicente García, R. (2005) Canal del potasio Kv 1.3: papel fisiológico y biología del complejo funcional [Tesis Doctoral], Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
65. Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2049–2057. doi: [10.1242/jeb.00241](https://doi.org/10.1242/jeb.00241)
66. Wu, Z., Wu, J., Zhao, Q. et al. (2020) Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clin Transl Oncol* 22, 631–646. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02187-8>

67. Xu, J. (2003). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human Molecular Genetics*, 12(5), 551–559. [doi:10.1093/hmg/ddg049](https://doi.org/10.1093/hmg/ddg049)
68. Xu, J., Wang, P., Li, Y., Li, G., Kaczmarek, L. K., Wu, Y., ... Desir, G. V. (2004). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 3112–3117. [doi:10.1073/pnas.0308450100](https://doi.org/10.1073/pnas.0308450100)
69. Yauk, C., Harrill, A., Ellinger Ziegelbauer, H., Van Der Laan, J., Moggs, J., Frötschl, R., Sistare, F., & Pettit, S. (2020). A cross-sector call to improve carcinogenicity risk assessment through use of genomic methodologies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 110, 104526. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104526>
70. Yu, M., Chen, S., Hong, W., Gu, Y., Huang, B., Lin, Y., Zhou, Y., Jin, H., Deng, Y., Tu, L., Chen, B., & Jian, Z. (2019). Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(4), 967–999. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02847-w>
71. Zhang, Z., Huang, S., Wang, H., Wu, J., Chen, D., Peng, B., & Zhou, Q. (2016). High expression of hexokinase domain containing 1 is associated with poor prognosis and aggressive phenotype in hepatocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(4), 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.007>
72. Zhang, D., Wang, H., Yu, W., Qiao, F., Su, X., & Xu, H. (2019). Downregulation of hexokinase 2 improves radiosensitivity of breast cancer. *Translational Cancer Research*, 8(1), 290–297. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.01.37>

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Catterall, W.A., Dib-Hajj, S., M.H. Meisler, and D. Pietrobon. *J. Neurosci.* 28(46): 11768-11777, 2008.
2. Hoffman, B. (2014) *Ginecología de Williams*, 2th ed. McGraw-Hill.
3. Kullmann, D.M. The neuronal channelopathies. *Brain* 125: 1177-1195, 2002.
4. Kullmann, D.M. Neurological channelopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 33: 151-172, 2010.
5. La Alianza de Recursos del Genoma: transformando la genómica comparada . 2023. Bult CJ, Sternberg PW. *Genoma de Mamm*, 2023;34(4):531-44. [doi: 10.1007/s00335-023-10015-2](https://doi.org/10.1007/s00335-023-10015-2). PMID: 37666946.
6. Llinás M, González J, Moreno C, Salazar F., Rodríguez Martínez J, Hernández Lorente M, Costa Ruiz J. (2001). Introducción a la experimentación con animales. 1a edición. Universidad de Murcia, pp. 85-94.
7. Mathupala S.P., Ko Y.H., Pedersen P.L. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*. 2006;25:4777–4786. [doi: 10.1038/sj.onc.1209603](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209603).
8. McCommis K.S., Douglas D.L., Krenz M., Baines C.P. Cardiac-specific hexokinase 2 overexpression attenuates hypertrophy by increasing pentose phosphate pathway flux. *J. Am. Heart Assoc.* 2013;2:e000355. [doi: 10.1161/JAHA.113.000355](https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000355).

9. Mukada, N., Tosaka, M., Matsumura, N., Yamaguchi, R., Aihara, M., Isoda, K., Higuchi, T., Tsushima, Y., Yokoo, H., & Yoshimoto, Y. (2021). Subtype-dependent difference of glucose transporter 1 and hexokinase II expression in craniopharyngioma: an immunohistochemical study. *Scientific Reports*, 11(1). doi:10.1038/s41598-020-80259-4
10. Penkert, J., Ripperger, T., Schieck, M., Schlegelberger, B., Steinemann, D., & Illig, T. (2016). On metabolic reprogramming and tumor biology: A comprehensive survey of metabolism in breast cancer. *Oncotarget*, 7(41), 67626–67649. doi:10.18632/oncotarget.11759

11. ANEXOS

Tabla A1.

Descripción de los tejidos analizados

Grupo	No. de Rata	Observaciones histológicas	Observaciones macroscópicas	Porcentaje del grupo
Fibrosarcoma	11	Metastasis en tejido adiposo y colon de fibrosarcoma	Metástasis: poliquístico, metástasis en ovario, hígado Peso rata: 402 gr.	10
Carcinoma	5	Carcinoma mamario de tipo adenoide quístico	Metástasis quística: quistes en peritoneo, tejido mamario observable, zona necrótica. Peso rata: 346	30
	9	Carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado, invasor	Peso rata: 345	
	12	Carcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado, invasor	Peso rata: 345	
Fibroadenoma	6	Equivalente a fibroadenoma mamario de tipo periductal	Tumor cartilaginoso, metástasis que se extiende a hígado, ovario y peritoneo. Peso rata: 338	20
	8	Equivalente a fibroadenoma mamario de tipo periductal	Tumor cartilaginoso, quistes y cartílago, tumor en ovario con contenido caseoso. Peso rata: 423	
Fibroquiste	2	Cambios fibroquísticos benignos	Tumor de mama contenido caseoso Peso rata: 317	40
	4	Fibrosis estromal del parénquima mamario	Tumor cartilaginoso Peso rata: 330	
	7	Fibrosis estromal con necrosis coagulativa y colicuativa del parénquima mamario	Tumor cartilaginoso, quistes y cartílago Peso rata: 423	
	10	Parénquima mamario hipertrófico	Peso rata: 387	

Tabla A2.*Imágenes de referencia histológica por grupos de tumores*

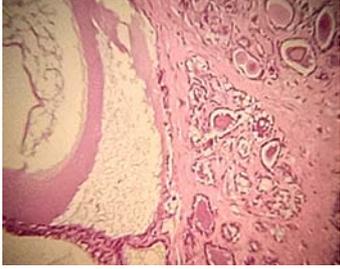
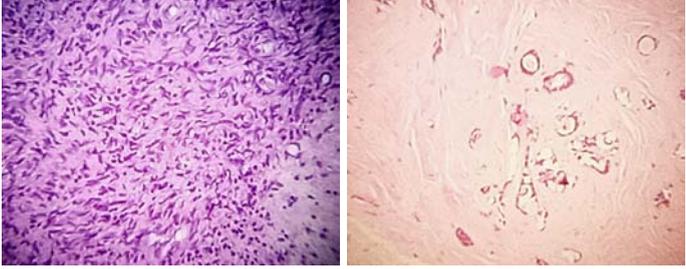
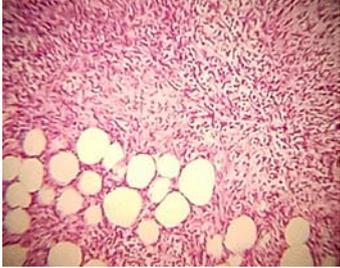
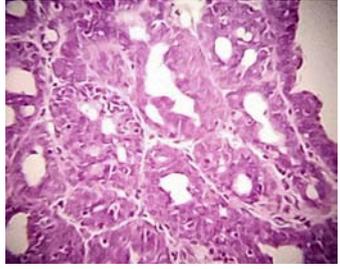
Grupo	No. Rata	Imágen
Fibroquiste	2	
Fibroadenoma	6 y 8	
Fibrosarcoma	11	
Carcinoma	5	
Control	13	

Tabla A3.
Datos de amplificación de genes

Grupo	18s		Kv1.1		Kv1.3		HXK1		HXK2		HXK3	
	Ct	Prom-Ct	Ct	Prom-Ct	Ct	Prom-Ct	Ct	Prom-Ct	Ct	Prom-Ct	Ct	Prom-Ct
Control	24,57		28,15		26,46		22,38		26,56		26,31	
	24,63		28,03		26,03		22,63		26,38		26,21	
	24,28		28,12		25,99		22,26		26,18		26,15	
	24,25				26,45		22,17		26,25		26,29	
	23,74	24,294		28,1	26,32	26,25	22,26	22,34	26,19	26,312	26,16	26,224
CNR	21,71		28,69		28,16		22,08		27,5		27,02	
	21,32		28,69		28,17		22,32		27,23		27,17	
	21,22		28,22		28,08		22,06		27,31		24,14	
	22,15		28,71		28,04		22,16		27,71		27,31	
	22	21,63	28,12	28,486	28,15	28,12	22,15	22,154	27,08	27,366	27,24	26,576
FSC	21,89		29,55		27,9		22,64		26,79		26,74	
	21,18		29,01		27,94		22,58		26,32		26,65	
	22,19		28,64		27,31		22,25		25,95		26,69	
	22,54		28,84		27,98		22,6		26,45		26,62	
	21,79	21,918	28,95	28,998	27,27	27,68	22,23	22,46	26,47	26,396	26,67	26,674
FADN	21,57		28,87		25,81		23,2		27,11		26,91	
	21,18		28,29		25,29		23,16		27,57		26,57	
	21,51		28,84		25,26		23,22		27,12		26,58	
	22,15		29,16		25,17		23,1		27,13		26,83	
	21,98	21,678	28,87	28,806	25,61	25,428	23,05	23,146	27,49	27,284	26,7	26,718
FOQS	21,94		28,46		28,09		23,7		27,06		26,18	
	20,04		28,12		28,12		23,39		27,39		26,78	
	20,83		28,06		28,14		22,8		27,66		26,63	
	20,11				27,97		23,44		27,31		26,97	
	20,69	20,722		28,21333333	28,17	28,098	23,65	23,396	26,77	27,238	26,83	26,678

Tabla A4.1

Datos de análisis de expresión por método de Livak

Muestra	ΔKv1.1-Hk3				ΔKv1.3-Hk3				ΔHXK1-HK3				
	Kv1.1	HXK3	ΔΔCT	2 ^Δ (-ΔΔCT)	Kv1.3	HXK3	ΔΔCT	2 ^Δ (-ΔΔCT)	HXK1	HXK3	ΔCT	ΔΔCT	2 ^Δ (-ΔΔCT)
Control	28,15	26,31			26,46	26,31			22,38	26,31	-3,93		
	28,03	26,21			26,03	26,21			22,63	26,21	-3,58		
	28,12	26,15			25,99	26,15			22,26	26,15	-3,89		
		26,29			26,45	26,29			22,17	26,29	-4,12		
		26,16			26,32	26,16			22,26	26,16	-3,9		
Desv. Estd.	0,0624	0,0733	-0,45	1,3635176	0,2264	0,0733	-1,518	2,863937482	0,1785	0,0733	-3,884	-0,602	1,517819253
CNR	28,69	27,02			28,16	27,02			22,08	27,02	-4,94		
	28,69	27,17			28,17	27,17			22,32	27,17	-4,85		
	28,22	24,14			28,08	24,14			22,06	24,14	-2,08		
	28,71	27,31			28,04	27,31			22,16	27,31	-5,15		
	28,12	27,24			28,15	27,24			22,15	27,24	-5,09		
Desv. Estd.	0,2385	1,3660	-0,16	1,11457986	0,0570	1,3660	0	1	0,1024	1,3660	-4,422	-1,14	2,203810232
FSC	29,55	26,74			27,9	26,74			22,64	26,74	-4,1		
	29,01	26,65			27,94	26,65			22,58	26,65	-4,07		
	28,64	26,69			27,31	26,69			22,25	26,69	-4,44		
	28,84	26,62			27,98	26,62			22,6	26,62	-4,02		
	28,95	26,67			27,27	26,67			22,23	26,67	-4,44		
Desv. Estd.	0,3905	0,0451	0,00	1	0,3574	0,0451	-0,538	1,45195828	0,2021	0,0451	-4,214	-0,932	1,907919101
FADN	28,87	26,91			25,81	26,91			23,2	26,91	-3,71		
	28,29	26,57			25,29	26,57			23,16	26,57	-3,41		
	28,84	26,58			25,26	26,58			23,22	26,58	-3,36		
	29,16	26,83			25,17	26,83			23,1	26,83	-3,73		
	28,87	26,7			25,61	26,7			23,05	26,7	-3,65		
Desv. Estd.	0,3632	0,1506	-0,24	1,17772275	0,2706	0,1506	-2,834	7,130483967	0,0706	0,1506	-3,572	-0,29	1,222640278
FOQS	28,46	26,18			28,09	26,18			23,7	26,18	-2,48		
	28,12	26,78			28,12	26,78			23,39	26,78	-3,39		
	28,06	26,63			28,14	26,63			22,8	26,63	-3,83		
		26,97			27,97	26,97			23,44	26,97	-3,53		
		26,83			28,17	26,83			23,65	26,83	-3,18		
Desv. Estd.	0,2157	0,3038	-0,64	1,5590494	0,0773	0,3038	-0,124	1,089752112	0,3585	0,3038	-3,282	0	1

Tabla A4.2.

Datos de análisis de expresión por método de Livak

Muestra	ΔHXK2-HK3				Δ18s-HK3			
	HXX2	HXX3	ΔCT	ΔΔCT	18s	HXX3	ΔCT	ΔΔCT
Control	26,56	26,31	0,25		24,57	26,31	-1,74	
	26,38	26,21	0,17		24,63	26,21	-1,58	
	26,18	26,15	0,03		24,28	26,15	-1,87	
	26,25	26,29	-0,04		24,25	26,29	-2,04	
	26,19	26,16	0,03		23,74	26,16	-2,42	
		0,088		-0,702	1,626758396		-1,93	-1,93
Devi. Estd.	0,1599	0,0733	0,1184		0,3529	0,0733	0,3219	
CNR	27,5	27,02	0,48		21,71	27,02	-5,31	
	27,23	27,17	0,06		21,32	27,17	-5,85	
	27,31	24,14	3,17		21,22	24,14	-2,92	
	27,71	27,31	0,4		22,15	27,31	-5,16	
	27,08	27,24	-0,16		22	27,24	-5	
		0,79		0		-4,946		0
Devi. Estd.	0,2448	1,3660	1,3554		0,3726	1,3660	1,1615	
FSC	26,79	26,74	0,05		21,89	26,74	-4,85	
	26,32	26,65	-0,33		21,18	26,65	-5,47	
	25,95	26,69	-0,74		22,19	26,69	-4,5	
	26,45	26,62	-0,17		22,54	26,62	-4,08	
	26,47	26,67	-0,2		21,79	26,67	-4,88	
		-0,278		-1,068	2,096524951		-4,756	0,19
Devi. Estd.	0,3034	0,0451	0,2922		0,5056	0,0451	0,5139	
FADN	27,11	26,91	0,2		21,57	26,91	-5,34	
	27,57	26,57	1		21,18	26,57	-5,39	
	27,12	26,58	0,54		21,51	26,58	-5,07	
	27,13	26,83	0,3		22,15	26,83	-4,68	
	27,49	26,7	0,79		21,98	26,7	-4,72	
		0,566		-0,224	1,167967395		-5,04	-0,094
Devi. Estd.	0,2265	0,1506	0,3331		0,3879	0,1506	0,3337	
FOQS	27,06	26,18	0,88		21,94	26,18	-4,24	
	27,39	26,78	0,61		20,04	26,78	-6,74	
	27,66	26,63	1,03		20,83	26,63	-5,8	
	27,31	26,97	0,34		20,11	26,97	-6,86	
	26,77	26,83	-0,06		20,69	26,83	-6,14	
		0,56		-0,23	1,172834949		-5,956	-1,01
Devi. Estd.	0,3390	0,3038	0,4355		0,7642	0,3038	1,0529	

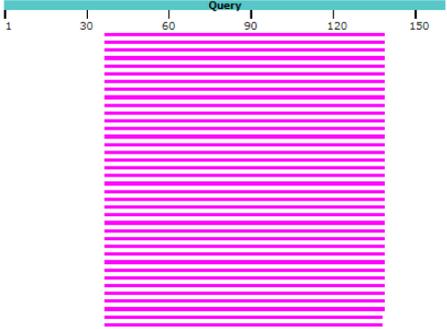
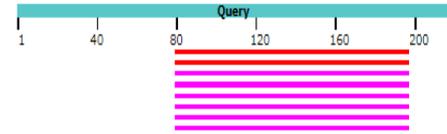
Tabla A5.

Datos sobre regresión lineal para validación

Dilución empleada		1:100		
Diluciones seriadas				
1	2	3	4	5
20,12	25,07	29,88	33,21	31,42
Análisis de regresión lineal				
A		3,074		
B		18,718		

Tabla A6.

Comprobación de secuenciación en base de datos BLAST.

Gen	Secuenciación	BLASTn																																																																																																			
<p>Kcna1</p>	<pre> NNNNNNNNTNCNTGANACGCANGACC GACNGNNANNATGTTCTCTGGGNTGT CGTAGTCTCAGACTTCATNNNNNAGGT TCTGGTTCTTCTCGTGGTTCACCTGCA CCCGCAGNATTCGAAAGGAAGACCCG CCGAGACTGNTTTGGTGGGGGTGTG GNN </pre>	<p>Distribution of the top 38 Blast Hits on 38 subject sequences</p> 																																																																																																			
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 1, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3915</td> <td>NM_001393711.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 2, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3648</td> <td>NM_012734.2</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X4, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3612</td> <td>XM_039098435.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X3, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3635</td> <td>XM_039098434.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3692</td> <td>XM_039098432.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7105089. **** WARNING: chimeric clone ****</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>6486</td> <td>BC095902.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus brain hexokinase mRNA, complete cds</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>145</td> <td>145</td> <td>63%</td> <td>3e-30</td> <td>90.29%</td> <td>3653</td> <td>J04526.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 1 (Hk1), mRNA</td> <td>Rattus rattus</td> <td>139</td> <td>139</td> <td>63%</td> <td>1e-28</td> <td>89.32%</td> <td>3494</td> <td>XM_032888314.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X2, mRNA</td> <td>Arvicanthis nilot...</td> <td>128</td> <td>128</td> <td>63%</td> <td>3e-25</td> <td>87.38%</td> <td>3875</td> <td>XM_034524609.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA</td> <td>Arvicanthis nilot...</td> <td>128</td> <td>128</td> <td>63%</td> <td>3e-25</td> <td>87.38%</td> <td>4021</td> <td>XM_034524608.1</td> </tr> </tbody> </table>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 1, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3915	NM_001393711.1	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 2, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3648	NM_012734.2	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X4, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3612	XM_039098435.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X3, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3635	XM_039098434.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3692	XM_039098432.1	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7105089. **** WARNING: chimeric clone ****	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	6486	BC095902.1	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus brain hexokinase mRNA, complete cds	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3653	J04526.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 1 (Hk1), mRNA	Rattus rattus	139	139	63%	1e-28	89.32%	3494	XM_032888314.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X2, mRNA	Arvicanthis nilot...	128	128	63%	3e-25	87.38%	3875	XM_034524609.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA	Arvicanthis nilot...	128	128	63%	3e-25	87.38%	4021	XM_034524608.1
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 1, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3915	NM_001393711.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant 2, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3648	NM_012734.2																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X4, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3612	XM_039098435.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X3, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3635	XM_039098434.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3692	XM_039098432.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7105089. **** WARNING: chimeric clone ****	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	6486	BC095902.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus brain hexokinase mRNA, complete cds	Rattus norvegicus	145	145	63%	3e-30	90.29%	3653	J04526.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 1 (Hk1), mRNA	Rattus rattus	139	139	63%	1e-28	89.32%	3494	XM_032888314.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X2, mRNA	Arvicanthis nilot...	128	128	63%	3e-25	87.38%	3875	XM_034524609.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Arvicanthis niloticus hexokinase 1 (Hk1), transcript variant X1, mRNA	Arvicanthis nilot...	128	128	63%	3e-25	87.38%	4021	XM_034524608.1																																																																																													
<p>Kcna3</p>	<pre> NCNAGNNAGCTGGNAGNNGGANCCT TGAGACACTCGTGTGCGCTTGACTCG TGTCGCTTGANNCTCNCNTTNTANAAA GCTTCTTCAGGCTGGTGTGAGTGACA GCTCGGAAGCTAGCCCCCTCAGTGAC AGTCACCTTTTTGCAATCGGAGGATGG GTCTGGGAAAGGGGCAGCGTTGGTC ACTCGTGTGCTTGAAGGGCGAGTA AAGGGGGG </pre>	<p>Distribution of the top 8 Blast Hits on 8 subject sequences</p> 																																																																																																			
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>206</td> <td>206</td> <td>54%</td> <td>2e-48</td> <td>98.29%</td> <td>3027</td> <td>NM_022179.2</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase type III mRNA, complete cds</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>206</td> <td>206</td> <td>54%</td> <td>2e-48</td> <td>98.29%</td> <td>3692</td> <td>U73859.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>195</td> <td>195</td> <td>54%</td> <td>5e-45</td> <td>96.58%</td> <td>2926</td> <td>XM_039095373.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>195</td> <td>195</td> <td>54%</td> <td>5e-45</td> <td>96.58%</td> <td>2910</td> <td>XM_006253603.4</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (white cell), mRNA (cDNA clone MGC:124544 IMAGE:7932574), comple...</td> <td>Rattus norvegicus</td> <td>195</td> <td>195</td> <td>54%</td> <td>5e-45</td> <td>96.58%</td> <td>3055</td> <td>BC100648.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X3, mRNA</td> <td>Rattus rattus</td> <td>189</td> <td>189</td> <td>54%</td> <td>2e-43</td> <td>95.73%</td> <td>2638</td> <td>XM_032884663.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA</td> <td>Rattus rattus</td> <td>189</td> <td>189</td> <td>54%</td> <td>2e-43</td> <td>95.73%</td> <td>2773</td> <td>XM_032884662.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA</td> <td>Rattus rattus</td> <td>189</td> <td>189</td> <td>54%</td> <td>2e-43</td> <td>95.73%</td> <td>3036</td> <td>XM_032884661.1</td> </tr> </tbody> </table>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), mRNA	Rattus norvegicus	206	206	54%	2e-48	98.29%	3027	NM_022179.2	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase type III mRNA, complete cds	Rattus norvegicus	206	206	54%	2e-48	98.29%	3692	U73859.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	2926	XM_039095373.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	2910	XM_006253603.4	<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (white cell), mRNA (cDNA clone MGC:124544 IMAGE:7932574), comple...	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	3055	BC100648.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X3, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	2638	XM_032884663.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	2773	XM_032884662.1	<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	3036	XM_032884661.1																		
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), mRNA	Rattus norvegicus	206	206	54%	2e-48	98.29%	3027	NM_022179.2																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase type III mRNA, complete cds	Rattus norvegicus	206	206	54%	2e-48	98.29%	3692	U73859.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	2926	XM_039095373.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	2910	XM_006253603.4																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus hexokinase 3 (white cell), mRNA (cDNA clone MGC:124544 IMAGE:7932574), comple...	Rattus norvegicus	195	195	54%	5e-45	96.58%	3055	BC100648.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X3, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	2638	XM_032884663.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X2, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	2773	XM_032884662.1																																																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus rattus hexokinase 3 (Hk3), transcript variant X1, mRNA	Rattus rattus	189	189	54%	2e-43	95.73%	3036	XM_032884661.1																																																																																													

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Estandarización de las muestras para tratamiento con DNAsas.</i>	20
Tabla 2. <i>Diseño y condiciones de oligonucleótidos</i>	21
Tabla 3. <i>Especificaciones de condiciones de reacción para RT-PCR.</i>	22
Tabla 4. <i>Mezcla de reacción para secuenciación de Sanger.</i>	29
Tabla 5. <i>Espectrofotometría en EPOCH de RNA correspondiente a muestras extraídas.</i>	32
Tabla 6. <i>Gráficas de Análisis de disociación para estandarización de oligonucleótidos.</i>	33
Tabla 7. <i>Concentración de oligonucleótidos en estandarización.</i>	35
Tabla 8. <i>Porcentajes de expresión en las muestras.</i>	36
Tabla 9. <i>Resultados de secuenciación de genes amplificados.</i>	40
Tabla 10. <i>Resultados de secuenciación de genes amplificados.</i>	41

Tabla A1. <i>Descripción de los tejidos analizados</i>	56
Tabla A2. <i>Imágenes de referencia histológica por grupos de tumores.</i>	57
Tabla A3. <i>Datos de amplificación de genes</i>	58
Tabla A4.1. <i>Datos de análisis de expresión por método de Livak</i>	59
Tabla A4.2. <i>Datos de análisis de expresión por método de Livak</i>	60
Tabla A5. <i>Datos sobre regresión lineal para validación</i>	60
Tabla A6. <i>Comprobación de secuenciación en base de datos BLAST.</i>	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. <i>Expresión génica en porcentajes del grupo control.</i>	36
Gráfica 2. <i>Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor carcinoma</i>	36
Gráfica 3. <i>Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibrosarcoma</i>	36
Gráfica 4. <i>Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibroadenoma</i>	36
Gráfica 5. <i>Expresión génica en porcentajes del grupo de tumor fibroquiste</i>	37
Gráfica 6. <i>Análisis de cada gen de acuerdo al grupo correspondiente al tipo de tumores.</i>	37
Gráfica 7. <i>Porcentaje de expresión del gen Hk1 en relación con el grupo control.</i>	38
Gráfica 8. <i>Porcentaje de expresión del gen Hk2 en relación con el grupo control.</i>	38
Gráfica 9. <i>Porcentaje de expresión del gen 18s rRNA en relación con el grupo control.</i>	38
Gráfica 10. <i>Porcentaje de expresión del gen Kcna1 en relación con el grupo control.</i>	38
Gráfica 11. <i>Porcentaje de expresión del gen Kcna3 en relación con el grupo control.</i>	38
Gráfica 12. <i>Representación de amplificación de las diluciones seriadas.</i>	39
Gráfica 13. <i>Análisis de reproducibilidad por regresión lineal</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Comparación anatómica e histológica entre la humana y de rata Wistar.</i>	9
Figura 2. <i>Esquema de distribución de microplaca para estandarización de genes por RT-PCR.</i>	24
Figura 3. <i>Esquema de distribución de microplaca para amplificación de genes por RT-PCR.</i>	26
Figura 4. <i>Esquema de distribución de microplaca para validación de reacciones por RT-PCR.</i>	28
Figura 5. <i>Electroforesis en gel de agarosa al 0.5%. Correspondiente a la extracción de RNA.</i>	31
Figura 6. <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Correspondiente a la prueba de amplificación de oligonucleótidos diseñados para 150 pb</i>	35