



**IZTACALA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**IZTACALA**

**BIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE UN TUMOR DE MAMA ESPORÁDICO  
MEDIANTE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA,  
HIBRIDACIÓN DE LA SECUENCIA DE EXPRESIÓN  
COMPARADA**

**Y MICROARREGLOS DE CDNA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A :**

**JORGE HUMBERTO ALVARADO RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**

**LOS REYES IZTACALA**

**FEBRERO 2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

'No hemos de asombrarnos de la extinción; si de algo hemos de asombrarnos, que sea de nuestra propia presunción al imaginar por un momento que comprendemos las muchas y complejas circunstancias de que depende la existencia de cada especie”.

**Charles Darwin**

## **DEDICATORIA Y PENSAMIENTOS**

*A mis queridos padres Esmeralda Ramírez Ruiz y Carlos Alvarado Hernández, por siempre darme un cariño esmeradamente paterno y amigo, todo cuanto humanamente se han sacrificado por dar lo mejor de sí. Los amo y los admiro con veneración religiosa.*

*A mis queridos hermanos Norma Elizabeth y Carlos, por apoyarme en todos los buenos y malos momentos. Los amo cual cariño de sangre protege y se apoya.*

*A mi querida novia Claudia Rebeca Solís Casas, quien con su amor y la voluntad de su razón me ha brindado lo bello de la vida, por alentarme en sublime y tierna actitud a cada instante, y por su apoyo siempre constante para lograr lo inalcanzable. La amo, cual niño con su llanto añora al amor de una madre.*

*A mi tío Jorge Vera Barrera, quien con su perseverancia es mi ejemplo a seguir.*

*GRACIAS POR TODO*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la FEZ Iztacala donde la trayectoria de mi carrera me dio y formó lo más importante en mi vida. ¡Gracias Iztacala!*

*A mis dos grandes maestros y amigos el Dr. Diego Julio Arenas Aranda y el Dr. Adán Valladares Salgado, sin quienes, hubiese sido imposible la realización de este trabajo, ¡gracias! Por brindarme toda la confianza y su apoyo desinteresado, cual digna labor de un verdadero profesor.*

*Con respeto y aprecio a mis maestros y sinodales, por su orientación en el manuscrito:*

*Dr. Sergio Vaca Pacheco*

*M. en C. Josefina Vázquez Medrano*

*M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres*

*M. en C. Gabriel Camarena Gutiérrez*

*A varios investigadores y profesores que desempeñaron también papeles importantes en el conocimiento experimental, a quienes deseo expresar mi gratitud por su amistad incondicional y por seguirme brindando más conocimiento:*

*Dr. Rafael Martínez Gallegos*

*Dra. Selene Pérez Herrera*

*Dra. Marta Elena Hernández Caballero*

*A mis amigos Rebeca Solís y Edith Venegas, Miguel Ángel, Adrián Bautista, Otón Montes, Mario Sánchez (Zorro), mi cuñado Juan García, mi cuñada Graciela Balseca, Marisela Cruz, Norma González, Verónica Correa, Daniel Chávez, Emilio Soriano y el Sr. Efrén Antonio.*

*A mis profesores M. en C. Carmen Álvarez, Gloria Garduño, Edith Gonzáles, Alberto Arriaga, Jorge Padilla, José Antonio, Jonathan y Rafael de ecología.*

# CONTENIDO

RESUMEN	PAG
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	3
2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER	3
DEFINICIÓN	3
REPASO HISTORICO	4
EL PRINCIPIO: APRENDIENDO A CAMINAR	4
HISTORIA NO TAN RECIENTE: Los primeros pasos	4
HACIA EL PROTOTIPO DE LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA	5
FACTORES DE RIESGO	5
CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA TUMORAL	5
2.2 HIBRIDACIÓN Y GENÉTICA MOLECULAR	6
2.3 TECNOLOGÍA Y CITOGENÉTICA MOLECULAR	6
HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA	7
HIBRIDACIÓN COMPARATIVA DE SECUENCIAS DE EXPRESIÓN	7
MICROARREGLOS	8
APLICACIÓN EN CÁNCER DE MAMA	8
ANATOMÍA Y ETAPAS CLÍNICAS	9
Anatomía	9
FIGURA 3.1 Estructura normal de la glándula mamaria	9
Etapas clínicas	10
Etapa I	10
Etapa II	10
Etapa III	10
Etapa IV	10
CLASIFICACIÓN MOLECULAR	10

<b>III.- OBJETIVOS</b>	11
3.1 OBJETIVO GENERAL	11
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	11
<b>IV.- MÉTODOS</b>	12
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE TEJIDO	12
4.2 LA UNIDAD DE MUESTRA	12
Esquema I Resumen general de la extracción de DNA y cDNA	12
4.2.1 Aislamiento de RNA total de células tumorales y no afectadas	13
4.2.2 Obtención de DNA de la muestra tumoral y no tumoral	14
4.3 ANÁLISIS CON HIBRIDACIÓN COMPARATIVA DE SECUENCIAS DE EXPRESIÓN	15
Esquema II Proceso simplificado de la técnica de CESH y CGH	15
4.3.1 Marcaje de cDNA sonda. Método de corte y síntesis	15
4.3.2 Mezcla de las sondas	16
4.3.3 Co-hibridación de las sondas en las metafases	16
4.3.4 Lavado de la laminilla	16
4.3.5 Visualización de la hibridación	16
4.4 ANÁLISIS CON HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA	17
4.5 ANÁLISIS CON MICROARREGLOS	17
Esquema III Diagrama general del proceso de microarreglos	17
4.5.1 Enriquecimiento de RNA poli A <sup>+</sup> y síntesis de la sonda	18
4.5.2 Purificación de los cDNAs	18
4.5.3 Hibridación de la sonda de cDNA	18
4.5.4 Procedimiento de revelado	19
<b>V.- RESULTADOS</b>	20
IMAGEN I. Micrografía de 1 metafase generada por CGH	20
TABLA 1. Número de metafases seleccionadas	21
TABLA 2 Regiones sobreexpresadas evidenciadas por CESH	22
TABLA 3 Regiones con alteraciones cromosómicas obtenidos con CGH	23
TABLA 4 Expresión de algunos genes obtenidos por análisis con microarreglos	25

FIGURA 1A. Comparación de los perfiles de expresión y genómico	26
FIGURA 1B. Análisis completo mediante CGH	27
FIGURA 2. Grafica relativa entre la posición genómica y sus niveles de expresión en base logarítmica <sup>2</sup>	28
FIGURA 3 Análisis de los patrones de expresión generados por microarreglos	29
TABLA 5 Identificación de Genes amplificados y sobreexpresados mediante las tres técnicas utilizadas en este trabajo	30
FIGURA 4 Resultado de hibridación de cDNA marcado con $\text{ÓP}^{32}$ de la Ciclina A en la membrana de microarreglos	30
<b>VI.- DISCUSIÓN</b>	31
<b>VII.- CONCLUSIONES</b>	36
<b>VIII.- GLOSARIO</b>	37
<b>IX.- GLOSARIO DE TERMINOS</b>	39
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA</b>	41
<b>XI.- ANEXO I agrupamiento jerárquico</b>	50
<b>XII.- ANEXO II Esquema de la membrana de microarreglos con 1,176 genes, utilizada en este trabajo</b>	51
<b>XIII.- ANEXO III Perfil generado con el programa de cómputo AtlasImage 2.0</b>	52



## **RESUMEN**

No es nueva la idea de una base molecular en la enfermedad. Los resultados que siguen arrojando el proyecto genoma humano y el proyecto anatómico de la genética del cáncer, impulsan cada vez más, muchas investigaciones en los procesos de regulación transcripcional de la información genética en los organismos vivos, en procesos de desarrollo y estados de enfermedad. En este trabajo se hace una breve sinopsis de la problemática actual en la enfermedad neoplásica de mama esporádica y en general, su pasado y futuro posible. Además, recopila y analiza la importancia de la micro-tecnología, y su impacto en la biología y en la medicina moderna, como base para proveer las herramientas necesarias en la prevención, tratamiento y cura definitiva del enfermo.

Se compararon sistemáticamente 3 metodologías citogenético-moleculares como son los microarreglos, CGH y CESH, en la caracterización de un tumor mamario no hereditario. Cada una reveló patrones genéticos específicos de datos moleculares ya descritos en varios estudios, como cambios estructurales que afectan la conducta de protooncogenes y genes supresores de tumor, factores de crecimiento, reguladores del ciclo celular, etc., (SFN, BRCD2, p57, Ciclina A, BRCA2, ERBB2, jun D, etc.) localizados en regiones cromosómicas de 1p<sup>+</sup>, 1q<sup>+</sup>, 1p<sup>-</sup>, 3p<sup>+</sup>, 4q<sup>+</sup>, 9q<sup>+</sup>, 11p, 13q<sup>+</sup>, 16p<sup>-</sup>, 17q<sup>+</sup> y 19p<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren un panorama diverso de la célula cancerosa, por lo que también, se precisa la necesidad de una interacción integral, no solo entre estas tres metodologías. Concluyéndose que se obtienen más amplios resultados al complementarse, donde cada una de las técnicas logra detectar lo que alguna de ellas por algún mecanismo diferente y por su límite de resolución no puede.

“...tan cierto siento y veo que vivo aunque no sepa nunca qué es la fuerza vital. Es una energía congénita, orgánica, genética; es el origen de mis fuerzas naturales, el genio interno de mi existencia.”

**Johann Gottfried Herder**

## ***I. INTRODUCCIÓN***

A pesar del gran contenido secuencial emanado por el Proyecto Genoma Humano, entre ellos el propio Genoma Humano consumado a mediados de junio del 2000; no son sino, los atributos de las complejas interrelaciones e interacciones de la organización del genoma y el transcriptoma, el propósito elemental en la visión moderna de la Biología (Velesculescu V., *et al.*, 1998; Venter C., *et al.*, 2001; Iseli C., *et al.*, 2002; Su A., *et al.*, 2002). En este sentido, una gran cantidad de proyectos experimentales examinan cuidadosamente la versatilidad espacio-temporal en los patrones de expresión del transcrito, en células, tipos de tejido, procesos metabólicos y cursos de enfermedad; en esta área, avances respetables en la investigación clínica del cáncer son ya perceptibles (Whitney A., *et al.*, 2003).

En materia de salud, se observa una problemática ascendente de esta enfermedad a nivel mundial (Romero R., *et al.*, 1997; Gariglio P., *et al.*, 2000), sólo en México por ejemplo, el cáncer de mama es la segunda causa de fallecimientos en el sexo femenino, correspondiendo a un 6% aproximadamente del cáncer en general (López O., *et al.*, 1997). El Instituto Nacional de Salud Pública menciona que en 1998 se registró un promedio de 9 defunciones diarias en mujeres mayores de 25 años de edad (Boletín Practica Medica Efectiva, 2001).

Dado que estas consecuencias de índole variada y dolosa en nuestra población solicitan procedimientos de diagnóstico y tratamiento más sistematizados, en este sentido radica la importancia de una clasificación caracterizada con base en un marco molecular, particularmente por que esta clase de trastornos comprenden atributos especiales; entre ellos, su variedad celular unida a una complicada “heterogeneidad genética y molecular” que dificulta en cierta medida el pronóstico y terapias clínicas, y como el grado de resolución alcanzado en la biología del cáncer de mama aún es escaso, en los últimos tiempos el incipiente desarrollo de la nanotecnología y la tremenda variedad aplicativa de metodologías y sistemas analíticos de “monitoreo molecular” permitirán resolver esta serie de inconvenientes, incluidos los de orden económico (Bertucci F., *et al.*, 2000; Sorlie T., *et al.*, 2001; Nadeau H., *et al.*, 2001; Iwao K., *et al.*, 2002; Dorris D., *et al.*, 2002; Zhang H.,

*et al.*, 2003; Hedenfalk I., *et al.*, 2003). Para ello, en nuestro país, dos instituciones dedicadas a la investigación en el D. F., como son: la UNAM y el C.M.N. siglo XXI, realizan independientemente algunos proyectos de alto nivel iniciados en el 2000, obteniendo resultados muy prometedores. Y tomando como punto de partida la finalización del primer ciclo del Proyecto genoma humano y el surgimiento del ambicioso Proyecto de la Anatomía Genómica del Cáncer (CGAP) (Nadeau H., *et al.*, 2001; Strausberg R., *et al.*, 2001), nuestro interés principalmente radica en la estandarización de tecnologías emergentes como Microarreglos, Hibridación Genómica Comparativa (CGH) (Resor L., *et al.*, 2001; Yang H., *et al.*, 2003) y la recientemente elaborada Hibridación Comparativa de Secuencias de Expresión (CESH) (Yong-J., *et al.*, 2001), cabe puntualizar no sin razón, de la naturaleza y la lógica de parte de estos diseños experimentales que día con día se afinan y mejoran, a decir, el CGH es una técnica citogenética molecular que sirve para identificar ganancias o pérdidas a nivel cromosómico en todo el genoma (Kallioniemi A., *et al.*, 1992; Lichter P., *et al.*, 2000), el CESH es un procedimiento Citogenético que registra los patrones específicos de expresión en regiones cromosómicas del genoma (Yong-J., *et al.*, 2001), y por último el análisis por Microarreglos que permite identificar directamente Genes o grupos de genes relacionados por perfiles de baja o alta expresión con funciones y características conocidas, proporcionando información acerca del estado celular (DeRisi J., *et al.*, 1997).

## **II. ANTECEDENTES**

Con el advenimiento de “la tecnología del DNA recombinante” se ha facilitado enormemente el entendimiento en la biología molecular celular (Alberts B., *et al.*, 1994; Arenas D., 1996), y gracias a su perfeccionamiento, la naturaleza de las bases moleculares en los padecimientos oncológicos no son más un misterio (Weinberg R., 1996).

“Numerosos grupos de investigación están desarrollando nuevas metodologías que permitirán no solo diagnosticar y clasificar con más detalle el fenotipo canceroso, también corregir estas clases de desordenes por terapia génica” (Arenas D., 1996; Baltimore D., *et al.*, 2000; Zhang H., *et al.*, 2003)

La descripción de la organización del genoma y de la arquitectura nuclear relacionada con las etapas de desarrollo y enfermedad en una proporción global son un reto científico profundo, que demandan un abordaje multidisciplinario de biólogos del genoma, biofísicos, bioquímicos, genetistas, etc., y también los enfoques por las disciplinas de biología, bioinformática, química, física, ciencia de los materiales y nanociencia. No obstante, nuestro conocimiento en la función de la secuencia genómica aun permanece limitado (O’Brien T., *et al.*, 2003)

### **2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER**

#### **DEFINICIÓN**

Con el descubrimiento de los protooncogenes y oncogenes como “c-myc, neu, cD1-E, ras” etc., genes supresores de tumor o antioncogenes como ‘Rb, p53, FHIT, BRCA1 -2” etc. y de los genes del sistema de reparación del DNA, fue viable entender los mecanismos moleculares de la transformación neoplásica (Baltimore D., *et al.*, 2000; Iwao K., *et al.*, 2002). Desde esta perspectiva, el cáncer es un padecimiento íntimamente asociado a una serie de alteraciones en el programa genético, que controla la expresión y función de genes claves en la división y diferenciación celular, apoptosis, sistemas de reparación del DNA, angiogénesis, entre otros. (Debuire B., 1991; Yong-Jie L., *et al.*, 2001)

Existen cerca de 200 formas distintas de cáncer, de acuerdo al tipo celular. (Baltimore D., *et al.*, 2000). Mitelman desde 1998 tiene publicado un catalogo de aberraciones cromosómicas en más de 46,000 neoplasias (Holland J., *et al.*, 2000).

En términos médicos el cáncer se denomina como blastoma, tumor o neoplasia. Delimitándose al tumor, como toda masa de tejido de neoformación, autónoma, de desarrollo ilimitado y anárquico, a consecuencia de una actividad anormal de sus células que lo constituyen, en pocas palabras; se le puede definir como una enfermedad en donde una línea celular crece y se multiplica descontroladamente sin responder a señales de regulación, capaz de expandirse indefinidamente. (Solomon E., *et al.*, 1991; Baltimore D., *et al.*, 2000; Holland J., *et al.*, 2000)

## **REPASO HISTORICO**

### ***EL PRINCIPIO: aprendiendo a caminar***

Aunque el conocimiento de la enfermedad procede desde la antigua Grecia. Es hasta la revolución industrial donde se reportan casos de tumores en el órgano nasal de trabajadores en chimeneas, relacionados con el primer carcinógeno ambiental descubierto. (Karp G., 2001)

En 1886, Broca supuso una anomalía heredada en el interior del tejido alterado de una familia afectada con cáncer de mama, además de otras explicaciones vertidas... (Holland J., *et al.*, 2000; Fearon E., 2000). De las primeras evidencias de virus tumorales vienen de las investigaciones efectuadas en pollos por Peyton Rous en 1910 (Bishop M., 1982), pero el citólogo alemán Theodor Boveri en 1914, concluye en base a sus observaciones —que las células malignas manifiestan cromosomas anormales y que cualquier suceso enlazado por tal aberración podría causar cáncer—(Cavenee W., *et al.*, 1995).

### ***HISTORIA NO TAN RECIENTE: los primeros pasos***

La primera evidencia experimental de los análisis citogenéticos del cáncer fue descrita por Nowell y Hungerford, y nombrada “cromosoma Filadelfia” en 1960. (Fearon E., 2000; Guízar-Vázquez, 2001)

Como fue formulado al final de la década de 1960`s por Robert Huebner y George Todaro; -los “oncogenes” retrovirales son una parte de la dotación genética de todas las células, y que podrían ser inofensivos ya que permanecen inactivos hasta que son estimulados—. Y comprobado por Michael Bishop y Harold Varmus en 1977. Un hallazgo inesperado entre la estrecha relación de un oncogen viral v-src. y un protooncogen celular de pollo y otras especies c-src. (Bishop., 1982; Baltimore D., *et al.*, 2000)

## **HACIA EL PROTOTIPO DE LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA**

Por 1947 Isaac Berenblum anuncia la demostración de la tumorigénesis en dos fases: el *inicio*, donde un agente ambiental muta un gen, y la *promoción*, intervienen agentes inductores que promueven cambios neoplásicos. (Shirley O., 1999; Karp G., 2001)

En el decenio de los 1950's Leslie Foulds propone un modelo de progresión tumoral, y por la misma época Hermann Muller propone que –el cáncer se origina “cuando una célula recibe múltiples mutaciones”—, el primer modelo más tarde lo amplía en los 1970's Nowell P., conocida como la ‘hipótesis de selección clonal’ en este modelo explica –una célula experimenta una mutación y sus descendientes experimentan otra más acrecentando su habilidad para escapar del control normal, y sus repetidas ocasiones para generar metástasis—(Cavenee W., *et al.*, 1995; Loeb L., *et al.*, 2003; Iwasa Y., *et al.*, 2004).

## **FACTORES DE RIESGO**

La mayoría de los canceres aparecen en forma esporádica durante la vida de una persona, afortunadamente solo una mínima proporción corresponde a factores hereditarios. (Gariglio P. *et al.*, 2000)

Hoy día se sabe que el ambiente y el estilo de vida predisponen un grado de riesgo. A estas unidades que inician la mayoría de los canceres se les denomina genéricamente “carcinógenos ambientales”, agrupándose en:

--físicos: radiaciones ionizantes, espectro UV, etc.

--químicos: arsénico, asbestos, benceno, formaldehído, hollín, etc

--biológicos: virus (papilloma-virus 16 y 18), bacterias (*Helicobacter pylori*),etc.

Los hábitos dietéticos negativos: como el consumo elevado de grasas, etc... Se le ha asociado más como una patología de la gente de edad avanzada. (Trichopoulos D., *et al.*, 1996; Maafs E., 1993)

## **CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA TUMORAL**

La transformación neoplásica comprende, forma y tamaño variable de las células (pleomorfismo), una diferenciación pobre, capacidad de proliferación continua en presencia de señales inhibitorias de crecimiento, modificaciones estructurales membranales; aumento de receptores de superficie y proteasas, disminución de uniones intercelulares, elementos

citoesqueléticos disminuidos, etc., forma y tamaño variable del núcleo (polimorfismo); aneuploidias y organizaciones cromosómicas anormales, etc.. (Shirley O., 1999; Baltimore D., *et al.*, 2000)

## **2.2 HIBRIDACIÓN Y GENÉTICA MOLECULAR**

En los 60's se descubren los fenómenos de renaturalización e hibridación de los ácidos nucleicos. El primer estudio experimental sobre la capacidad de "reasociación de las moléculas de DNA monocatenario en moléculas estables bicatenarias" fue presentado por Julius Marmur y colaboradores. Esta perspectiva hizo posible el nacimiento de un conjunto de procedimientos conocidos como "hibridación del ácido nucleico" que permitieron definir con gran detalle "la naturaleza y funciones del material genético". (Karp G., 2001)

No obstante no fue sino hasta casi nueve años de esta observación fundamental que Mary Pardue y Joseph Gall; con sondas de DNA satélite marcadas radiactivamente e incubadas en una preparación de cromosomas metafásicos y reveladas por autorradiografía, elaboraron la "hibridación in situ". (Karp G., 2001; Guízar -Vázquez, 2001)

Para 1970, causó sorpresa el descubrimiento de "las bandas cromosómicas en humanos" por Caspersson; dando auge a los "métodos de bandeo", y su impacto en el área citogenética. El genoma humano posee una elevada organización estructural, repartida en una serie de 46 cromosomas. Cada uno de los cuales exhibe en células en metafase patrones de bandas transversales característicos, como resultado específico de la metodología de tinción usada, la mejor distinguida hasta ahora; la de Tripsina, revela concretamente segmentos cromosómicos claro-oscuros "bandas G" o "bandeo GTG", proporcionando criterios complementarios de clasificación, identificación, corroboración, localización y mapeo, etc. de genes en la longitud del cromosoma, y alteraciones vinculados en estos. (Guízar-Vázquez, 2001)

## **2.3 TECNOLOGÍA Y CITOGÉNÉTICA MOLECULAR**

Desde la década pasada, los perfeccionamientos en las tecnologías como las de microarreglos y las de análisis de cromosomas en metafase; hechos con el propósito: de superar los límites de sus propios precursores y para concretar regiones significativas de virtualmente muchos tipos de tumor que reflejan una enorme complejidad de la alteración de sus funciones genéticas (Gershon D., *et al.*, 2000; Gray J., *et al.*, 2000; Plass C., 2002).

Permitirán una base mecánica exacta para subclasificar la enfermedad y poder predecir el curso de su historia natural, además proporcionará nuevas metas de diagnóstico precoz, y la creación de tratamientos más específicos sustentados por su fisiopatología (Bertucci F., *et al.*, 2000; Garnis C., *et al.*, 2004).

Los sensores de DNA múltiples, denominados “chips” de DNA, cDNA y arreglos de oligonucleótidos, chips de matrices de CGH son una realidad (Steel A., *et al.*, 2000; Lichter P., *et al.*, 2000; Garnis C., *et al.*, 2004).

### **HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA**

Los métodos de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en su mayoría no pueden interpretar los complejos cariotipos de los tumores sólidos, y para superar estos inconvenientes la Hibridación Genómica Comparativa (CGH) fue introducida.(Gray J., *et al.*, 2000)

En un estudio publicado por Kallioniemi y colaboradores se diseñó un nuevo método Citogenético denominado Hibridación Genómica Comparativa (CGH) capaz de detectar alteraciones cromosómicas como amplificaciones y pérdidas. Consistente en hibridar simultáneamente DNA de referencia tumoral y no tumoral marcados con fluoróforos en rojo o verde en laminillas de metafase, y revelándose a través de un programa computacional. (Kallioniemi A., *et al.*, 1992)

Conforme a ello, y a pesar de su gran utilidad como herramienta indispensable, tiene la limitante de una resolución de 10-20 Mb lo cual no provee una información cuantitativa acerca de la dosis de un gen, una vez que las regiones susceptibles o anómalas se hallan definidas en rangos aproximados de 1 Mb (Kallioniemi A., *et al.*, 1992; Gray J., *et al.*, 2000)

### **HIBRIDACIÓN COMPARATIVA DE SECUENCIAS DE EXPRESIÓN**

Este conjunto de evidencias experimentales abrieron una nueva línea de investigación conocida como Hibridación Comparativa de Secuencias de Expresión (CESH), que utiliza los mismos principios del CGH, solo que las sondas a hibridar corresponden a RNAm procesado a cDNA. (Yong-Jie L., *et al.*, 2001)



## MICROARREGLOS

De introducción relativamente reciente y con el desarrollo de las técnicas moleculares se originó un sistema para estudiar el genoma humano, denominado **Microarreglos**. Su concepto básico, es un soporte sólido (membranas de nylon o cristal) revestido con una fina capa de cDNA, oligonucleótidos o fragmentos genómicos que actúan como moléculas detectoras. (Holloway J., *et al.*, 2002)

## APLICACIÓN EN CÁNCER DE MAMA

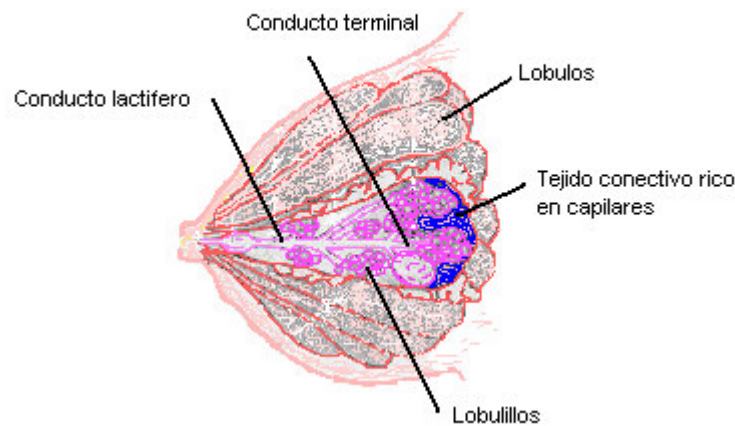
La profundización en el conocimiento de ‘la transformación oncogénica’, que opera cuando las versiones normales ‘protooncogenes, genes supresores de tumores, y los genes de reparación del DNA’ sufren cambios moleculares ha sido avalada por una gran cantidad de trabajos científicos. (Yong-Jie L., *et al.*, 2001; Gariglio P., 2000). En el cáncer de mama dan cuenta de ello (Cornelisse C.J., *et al.*, 1992), mutaciones puntuales o inversiones en genes BRCA1-2, p53, y ATM, etc. para los casos hereditarios, (Fútreal PA., *et al.* 1994; Collins N., *et al.*, 1995; Birch JM, *et al.* 1994; Vorechovsky I, *et al.*, 1996) amplificaciones en protooncogenes como c-myc y erbb2, rearrreglos estructurales en varios cromosomas, pérdida de regiones cromosómicas o cromosomas completos, 17 y 19, etc. (Dutrillaux B., *et al.*, 1990; Thompson AM, *et al.*, 1993; Pandis N., *et al.*, 1995) Diversos estudios realizados en esta neoplasia no han sido concluyentes debido a la diferencia de criterios relacionados con las características de la población analizada. No obstante varios fragmentos de los cromosomas 1, 3, 11, 13, 16, 17 y 22 proporcionan datos con valor de pronóstico. (Isola J., *et al.*, 1995; Bieche I, *et al.*, 1995; Allione F., *et al.*, 1998)

Para 1994 fueron utilizadas técnicas citogenético-moleculares en esta patología, en particular la de Hibridación **in situ** fluorescente (FISH) y la Hibridación Genómica Comparativa (CGH), con las cuales se pudo apreciar la existencia de aberraciones como amplificaciones, pérdidas, etc., e indicar la presencia de genes potencialmente involucrados en el progreso de esta neoplasia. Las derivaciones obtenidas sugieren que las regiones 13q31, 17q22-q24 y 20q13 pueden comprender genes involucrados en la generación del tumor. (Kallioniemi A., *et al.*, 1994; Muleris M., *et al.*, 1994)

Metodologías como los microarreglos son interesantes por que permiten comparar cuales genes están sobrepresados o poco expresados en el tumor respecto a su contraparte no tumoral, (<http://www.biomednet.com/hmsbeagle>.) los ensayos de ácidos nucleicos explotan los resultados obtenidos del proyecto Genoma Humano, que ha generado secuencias parciales de miles de genes humanos (Aaronson J., *et al.*, 1996), fundamentalmente consisten en hibridar poblaciones de cDNAs, obtenidos de líneas celulares o tumores, a membranas de nylon o vidrio con secuencias de diversos genes, en algunos casos más de 15,000 genes diferentes. Permitiendo examinar paralelamente la expresión de múltiples genes. (Atlas cDNA expression arrays user manual. Clontech.; Supplement to Nat Genet 1999; Brooks bank., <http://www.biomednet.com/hmsbeagle>.)

### ANATOMÍA Y ETAPAS CLÍNICAS

#### Anatomía:



**FIGURA 3.1 Estructura normal de la glándula mamaria.** Diagrama anatómico de la mama en plano sagital.

Las glándulas mamarias son glándulas tubuloalveolares compuestas, formadas de 15 a 20 lóbulos aproximadamente. Tejido conectivo separa los lóbulos y cada lóbulo se subdivide en múltiples lobulillos que desembocan en conductos que se van ramificando (figura 3.1). (Coleman W., *et al.*, 2002)

### **Etapas clínicas:**

Esta patología suele clasificarse en base al sistema TNM (T define la masa tumoral, N la afectación de los ganglios linfáticos y M la presencia de metástasis) del “*American Joint Committee on Cancer*”, que permite definir un cuadro de pronóstico y tratamiento clínico etapa por etapa:

**Etapa 0:** inicio de una lesión maligna intraductal o lobulillar, multicentrico sin adenopatías ni metástasis.

**Etapa I:** de 0.5-2.0cm. sin adenopatías ni metástasis.

**Etapa II:** dividido en estadio A y B, de 2.1-5.0cm. con o sin adenopatía axilar móvil.

**Etapa III:** dividido en estadio A y B, es heterogéneo y amplio, sin metástasis o inflamatorio.

**Etapa IV:** de cualquier tamaño y con metástasis a distancia, con o sin adenopatías. (Romero R., *et al.*, 1997; Braunwald E., *et al.*, 2002)

### **CLASIFICACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR**

Kallioniemi O. ha señalado las ventajas de la integración de las tecnologías del biochip en la exploración molecular oncológica. (Mihich E., *et al.*, 2002) También se ha mencionado que los perfiles de expresión genética proporcionan más información para una subclasificación en la identificación histopatológica en linfomas, leucemia, y cánceres de mama y pulmón. (Zhang H., *et al.*, 2003; Garnis C., *et al.*, 2004)

Pero, todavía falta mucho por comprender, la relación de progresión fenotípica con sus eventos genotípicos. (Royle R., *et al.*, 1999)

### ***III. OBJETIVOS***

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar a nivel cromosómico alteraciones estructurales y patrones de expresión génica entre células de mama con y sin neoplasia.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar alteraciones estructurales y de expresión en células tumorales de mama mediante hibridación genómica comparativa y la hibridación de secuencias de expresión comparada.
- Determinar e identificar los posibles genes responsables en un tumor mamario esporádico y su estado de expresión, tales como oncogenes, genes supresores, factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, etc. mediante el sistema de microarreglos .
- Analizar y comparar la reciprocidad entre los datos de las tres técnicas como reflejo de su genoma.

## IV. MÉTODOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE TEJIDO

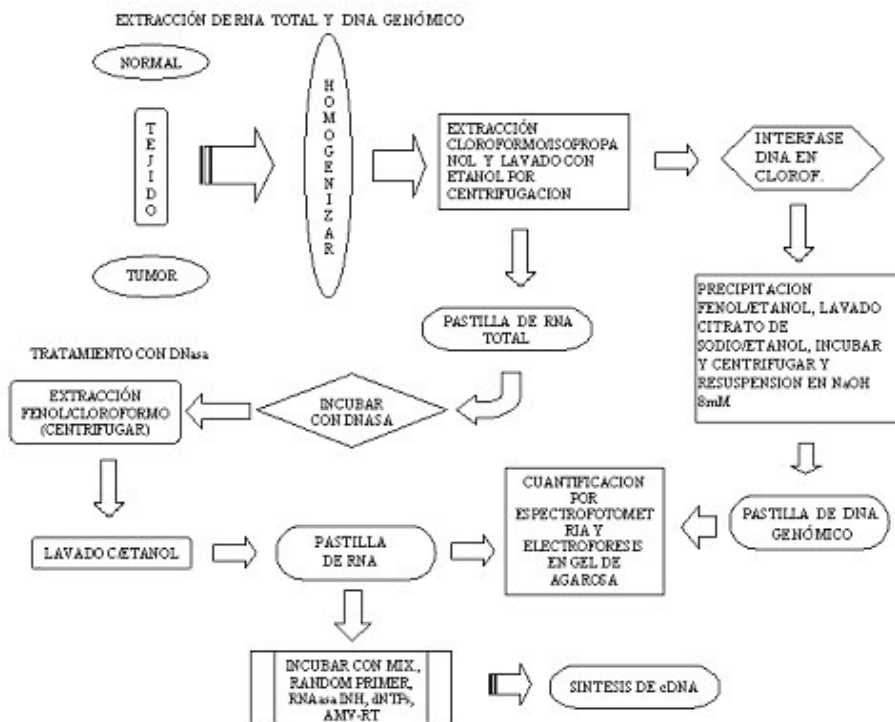
A).- tejido mamario fresco tumoral y tejido mamario no afectado obtenidos, en el Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional Siglo XXI

B).- el traslado de la muestra se efectuó en un contenedor con nitrógeno liquido

C).- muestras de 400mg-1000mg se almacenaron en un ultra congelador a  $-70$  grados centígrados hasta su uso.

D).- un fragmento del tejido se fijó en formol, para la estadificación TNM por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología, utilizando los criterios del Comité Americano en Cáncer (Cotran R., et al. 1994).

### 4.2 LA UNIDAD DE MUESTRA:



**ESQUEMA I** Resumen general de la extracción de DNA y RNA total. El RNA total se obtuvo mediante el uso de **(RNA Isolator, Genosys Biotechnologies Inc.)** y aplicándosele el tratamiento libre de DNasa **(Atlas Pure Total RNA Labeling System User Manual, Clontech Inc.)**. Se cuantificó por espectrofotometría y se verificó su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1%. A partir del RNA total, se sintetizó cDNA con el **(cDNA Cycle Kit Versión D Invitrogen, life technologies)**. En la obtención de la fase acuosa antes de adicionar el isopropanol en la parte de la precipitación para el RNA se extrajo la interfase acuosa aislandose el DNA mediante el protocolo establecido de **(RNA Isolator, enosys Biotechnologies Inc.)**. Se cuantificó por espectrofotometría y se verificó su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### 4.2.1 Aislamiento de RNA total de células tumorales y no afectadas

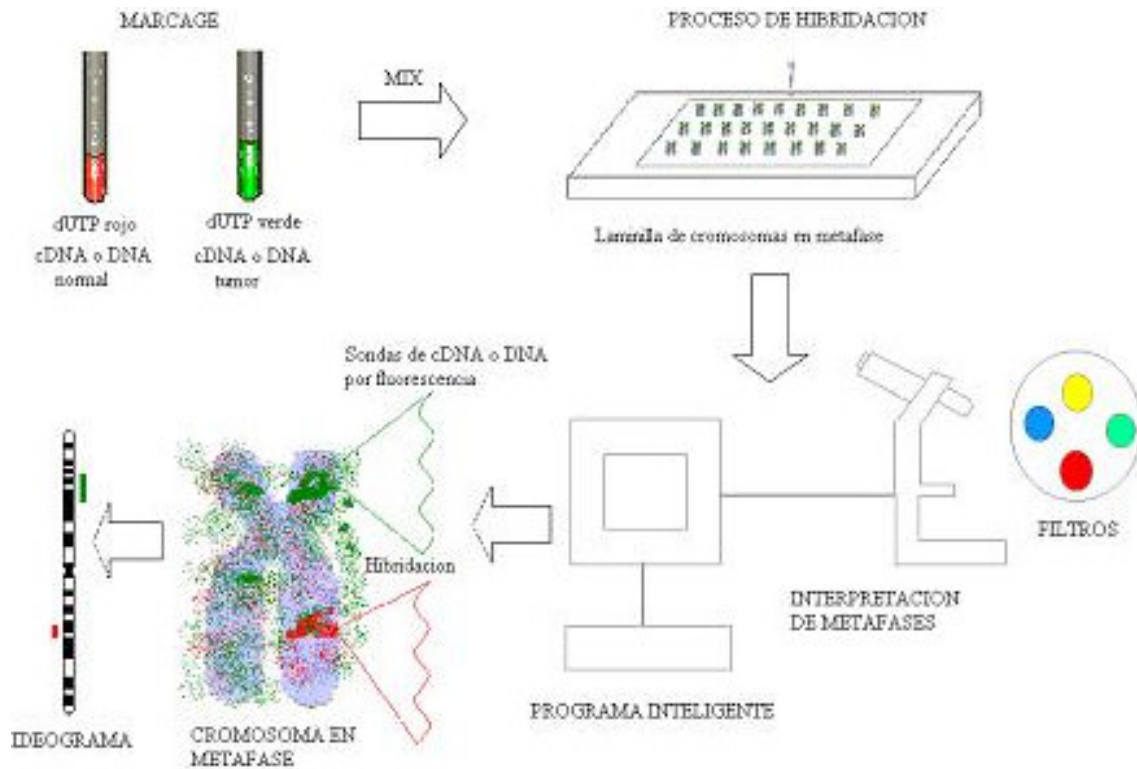
El RNA total se obtuvo mediante el uso de (**RNA Isolator, Genosys Biotechnologies**) todo el proceso se realizó a 4°C. 540 mg de tejido y 5 ml de RNA Isolator se licuaron con el homogenizador de tejidos e incubaron a temperatura ambiente 5 minutos. Se añadieron 10ml de cloroformo mezclando bien por 15 segundos e incubó a temperatura ambiente 15 minutos. Se centrifugó a 11,000rpm, 20 minutos a 4°C y se guardó la interfase, a la fase acuosa se añadieron 2.5 ml de isopropanol e incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Se centrifugó a 11,000rpm, 15 minutos a 4°C. Se lavó la pastilla varios tiempos con 5 ml de etanol-DEPC al 75% y se centrifugó a 8,000 rpm, 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante, se secó durante 10 minutos, y se resuspendió la pastilla en 500 µL de agua-DEPC. Se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda en 260nm y 280nm y se verificó su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se guardó a -70°C hasta aplicar el tratamiento libre de DNAsa (**Atlas Pure Total RNA Labeling Sistem User Manual, Clontech Inc.**). En un tubo ependorf de 1.5 ml se mezclaron 500 µl de RNA total (1mg/ml), 100 µl de buffer DNAsa I 10X, 50 µl de DNAsa I (1 U/µl ) y 350 µl de agua desionizada para un volumen total de 1 ml, y se incubó a 37°C por 30 minutos y se detuvo la reacción con 100 µl de la mezcla de terminación 10X. Se adicionaron 500 µl de fenol saturado, 300 µl de cloroformo y se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Se añadieron 550 µl de cloroformo a la fase acuosa y se repitió la centrifugación. Se obtuvo la fase superior y se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 2M y, 2.54 volúmenes de etanol al 95% y se incubó a 0 °C por 10 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C por 15 minutos y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 80% y se resuspendió la pastilla en 250 µl de agua libre de RNAsa.

Síntesis de cDNA: A partir del RNA total, se sintetizó cDNA con el (**cDNA Cycle Kit Versión D Invitrogen, life technologies**). Se usó entre 5-40 µl ó 0.05-5 µg de RNA total a un volumen 11.5 µl y se adicionó 1 µl de “random primers” a una concentración de 0.5-1.0 µM y se incubó a 65 °C, 10 minutos y 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 1 µl RNAsa inhibidor, 4 µl 5X RT buffer, 1 µl 100 mM dNTPs, 1 µl 80 mM pirofosfato de sodio y 0.5 µl AMV-RT se mezcló y centrifugó en breve y se incubó a 42 °C, 60 minutos. Se incubó a 95°C, 2 minutos y se enfrió rápidamente.

#### 4.2.2 Obtención de DNA de la muestra tumoral y no tumoral

En la obtención de la fase acuosa antes de adicionar el isopropanol para precipitar el RNA se separó la interfase acuosa aislándose el DNA mediante el protocolo establecido de RNA Isolator. Se adicionaron 1.5 ml de etanol al 100%, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugó a 2,000 rpm a 4 °C, 5 minutos. Se lavó la pastilla con 5 ml de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10% e incubó a temperatura ambiente, 30 minutos. Se centrífugo a 2,000 rpm a 4 °C, 5 minutos y resuspendió la pastilla en 8.75 ml de etanol al 75% e incubó 20 minutos a temperatura ambiente, se repitió la centrifugación y se secó 10 minutos. Se disolvió la pastilla en 26.7 ml de hidróxido de sodio 8 mM y centrífugo a 12,000 rpm, 10 minutos y el sobrenadante se resuspendió en 500 µl de agua estéril. Se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda en 260nm y 280nm y se verificó su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## 4.3 ANALISIS CON HIBRIDACIÓN COMPARATIVA DE SECUENCIAS DE EXPRESIÓN



### ESQUEMA II Proceso simplificado de la técnica de CESH y CGH.

El cDNA o DNA empleado se marcó mediante (Vysis CGH “Nick Translation” Kit) con fluorocromos (“Spectrum Red” dUTP a la línea celular no afectada y con “Spectrum green” dUTP a la línea tumoral). Una vez marcados los cDNAs o DNAs se procedió a hibridar 5µg de cada muestra simultáneamente sobre cromosomas en metafase de células no afectadas.

La hibridación se reveló con anticuerpos antibiotina-FITC (verde), antidigoxigenina-RITC (rojo) y los cromosomas con el colorante 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI azul), y se observó en un microscopio de triple banda. Las imágenes fueron almacenadas e interpretadas con el equipo Power gene para CGH el cual tiene el programa especial que realiza la cariotipificación.

#### 4.3.1 Marcaje de cDNA sonda. Método de corte y síntesis.

Se realizó el procedimiento de acuerdo al recomendado por la casa comercial Vysis Inc.

Se efectuó a 4°C a menos de lo indicado.

En un tubo Eppendorf de 0.5 ml se colocaron 20 µl de cDNA, 2.5 µl 0.2 mM “Spectrum Green” o “Spectrum Red” dUTP, 5 µl 0.1 mM dTTP, 10 µl dNTP mix, 5 µl 10X “nick translation buffer”, 10 µl “nick translation enzyme” y 1.0 µl RNAsa H 2/u para un volumen total de 53.5 µl. Se mezcló brevemente con vortex. Se incubó 30 minutos a 15 °C y se inmovilizó la reacción a 74 °C ± 1°C, 10 min.



#### 4.3.2 Mezcla de las sondas.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5.0 µg (53.5 µl) de cDNA marcada por corte y síntesis (color verde), e igual cantidad de cDNA no tumoral (etiquetado en rojo), 45 µg de DNA-cot., 12 µl acetato de sodio 3M y 400 µl de etanol al 100% para precipitar el cDNA, se mezcló y se incubó 15 min. a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 12000 rpm, 30 minutos. Se comenzó el tratamiento de la laminilla. Después de precipitar la pastilla de cDNA se lavó con 100µl de etanol al 90%, se centrifugó a 14,000 rpm, 5 minutos, se secó y resuspendió la pastilla en 3µl de agua estéril y 7µl de buffer CGH para hibridación. La sonda se desnaturalizó a  $73^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 8 minutos en baño María.

#### 4.3.3 Co-hibridación de la sonda en las metafases.

Con un lápiz diamante se marcaron las áreas de la laminilla que contenían las células normales en metafase. Se deshidrató con ácido acético al 70%, 10 minutos y se lavó con PBS. Se agregaron 20 µl de RNAsa A e incubó 30 minutos. Se lavó en SSC 2X, 2 minutos. Se desnaturalizó en solución de formamida al 70% en 20XSSC, pH7 a  $74^{\circ}\text{C}$ , 3 minutos. Se deshidrató pasándola por 2 min. en soluciones frías a  $-20^{\circ}\text{C}$  de etanol al 70%, al 85% y al 100% respectivamente. Se colocó en una parrilla a  $42^{\circ}\text{C}$  y se agregó la sonda previamente desnaturalizada. Se aplicó un cubreobjetos y se selló con cemento iris y se incubó laminilla en una cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

#### 4.3.4 Lavado de la laminilla.

Se removió el cubreobjetos, se lavó en solución 0.4X SSC/0.3 % NP-40 a baño maría a  $74^{\circ}\text{C}$ , 3 minutos. Se pasó a un lavado en solución 2X SSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente 3 minutos y se secó en la oscuridad.

#### 4.3.5 Visualización de la hibridación.

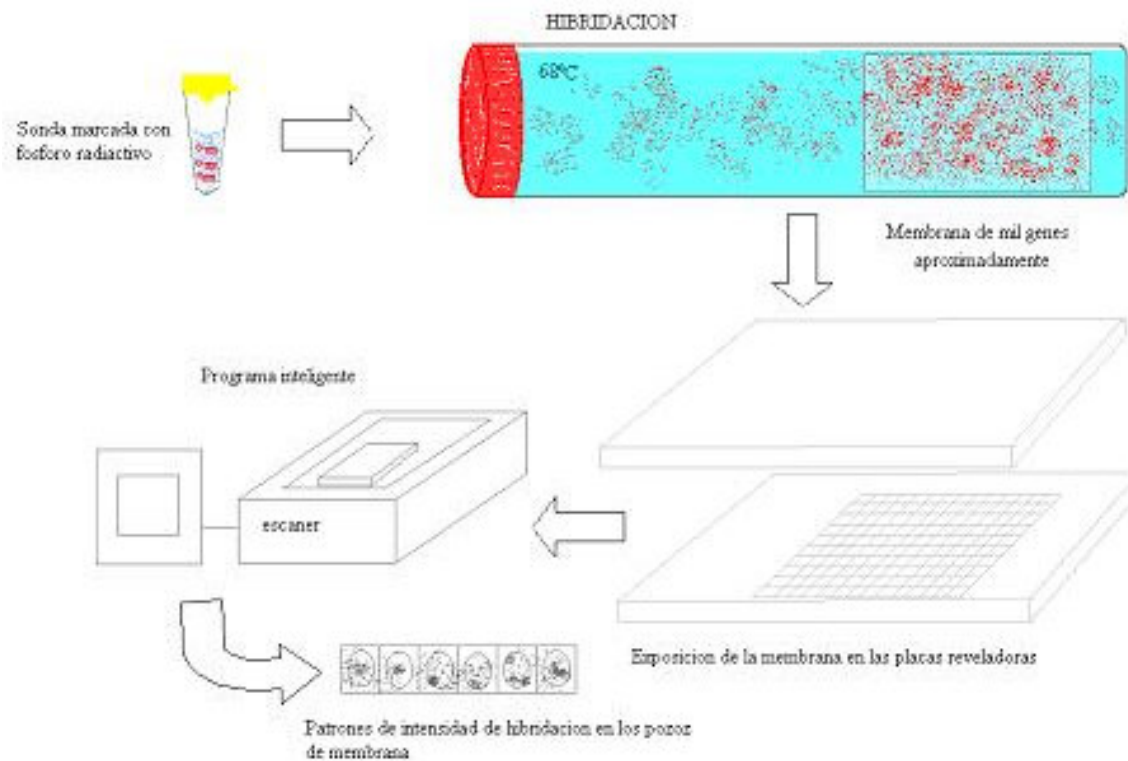
Se aplicaron 10 µg de DAPI II (azul) para teñir los cromosomas.

Las metafases híbridas se observaron bajo un microscopio equipado con filtros de excitación específicos. Esta información fue almacenada y analizada con el equipo Power gene el cual contiene el programa Quips (**Vysis**) que realiza la cariotipificación y el análisis de imágenes. Así las regiones que tiñeron para verde representaron ganancias o amplificaciones y en rojo, pérdidas. (Kallioniemi A. *et al.*,1992; Yong-Jie L., *et al.*, 2001)

#### 4.4 ANALISIS CON HIBRIDACIÓN GENOMICA COMPARATIVA

El DNA tumoral se marcó mediante “**Nick Translation**” empleando dUTP “fluoro-green” y el DNA no tumoral con dUTP “fluoro-red”, se hibridó simultáneamente una cantidad de 200 ng y 100 ng de cada muestra respectiva en laminillas de metafases celulares normales, como el método detallado en el apartado 4.3 (CGH “**Nick Translation**” Kit, Vysis Inc.) (ESQUEMA II).

#### 4.5 ANALISIS CON MICROARREGLOS



**ESQUEMA III** Diagrama general del proceso de microarreglos.

El cDNA se marcó radiactivamente con  $\alpha\text{-P}^{32}$ , se purificó por columnas de NúcleoSpin centrifugándose, y se hibridó una cantidad de 80  $\mu\text{g}$  de la muestra tumoral, incubando a 68°C en agitación continua, durante 48 horas, contra membranas de nylon que tienen fijadas cerca de 1,176 secuencias de genes relacionados con factores de crecimiento, oncogenes, genes supresores, reparación del DNA, adhesión celular, apoptosis, etc.. Al término de la hibridación, se lavó la membrana y se expuso a una placa auto radiográfica (Molecular Dynamics) por 72 horas, para su revelado; y con el software “Atlas Imagen 2.0, Cluster y TreeView” Microarray se analizó el patrón de hibridación con un scanner Storm 680, Molecular Dynamics, Inc. para radiactividad. (Atlas cDNA expression arrays user manual. Clontech.Inc.)

#### 4.5.1 Enriquecimiento de RNA poli A<sup>+</sup> y síntesis de la sonda.

Las perlas magnéticas unidas a la estreptavidina, se lavaron 3 veces con el amortiguador de unión 1X, utilizando un separador magnético. En un tubo de microcentrifuga se colocaron 80  $\mu$ g de RNA total. Se agregó 1  $\mu$ l del oligo dT biotinilado e incubó a 70°C. Se enfrió el tubo a temperatura ambiente, se separaron las perlas y se agregaron 50  $\mu$ l de amortiguador de reacción 2X a las perlas magnéticas. Se recuperaron las perlas magnéticas y se resuspendieron en 6  $\mu$ l de agua libre de RNAsas. Se preparó la mezcla de marcaje con 4  $\mu$ l de Amortiguador de reacción 5X, 2  $\mu$ l de dNTPs 10X (para dATP marcado), 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -P<sup>32</sup> (3000 Ci/mmol, 10 uCi/  $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de ditionitro (DTT 100mM). Al tubo con las perlas magnéticas se agregaron 4  $\mu$ l de oligonucleótidos y se incubaron 65°C durante 2 minutos y después a 50°C por 2 minutos. Al tubo que contiene la mezcla de marcaje se adicionaron 2  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa MMLV. Se mezclaron los dos tubos e incubaron a 50°C por 25 minutos y se detuvo la reacción con 2  $\mu$ l de la mezcla de terminación 2X.

#### 4.5.2 Purificación de los cDNAs.

El sobrenadante obtenido de la etapa anterior se transfirió una columna (Clontech Inc.). Se agregaron 200  $\mu$ l de buffer NT2 y se centrifugo a 14000 rpm por 1 minuto. Se repitió 2 veces más. Con 400  $\mu$ l buffer NT 3 se repitió el paso anterior 2 veces. Se adicionaron 100  $\mu$ l de buffer NE a la sonda. Se tomó una pequeña muestra de la sonda para medir radioactividad con un contador de centelleo, las cuentas por minuto deberán ser mayores de 1,000 000.

#### 4.5.3 Hibridación de la sonda de cDNA.

La solución de hibridación se añadió en un tubo de hibridación de 500 ml. e incubó con agitación a 68°C. Se calentaron a 95-100°C, 0.5 mg DNA de esperma de salmón e inmediatamente se colocó en hielo y se agregó al tubo que contenía la solución de hibridación. Dentro del tubo de hibridación se colocó cuidadosamente la membrana de nylon cuidando que quedara uniformemente distribuida. Se adicionaron 5  $\mu$ g de DNA C<sub>0</sub>t-1 a la sonda marcada e incubó a 100°C y se mantuvo a 4 °C en hielo y se agregó al tubo de hibridación. Se realizó la hibridación durante 12 horas con agitación continua a 68°C.

#### 4.5.4 Procedimiento de revelado.

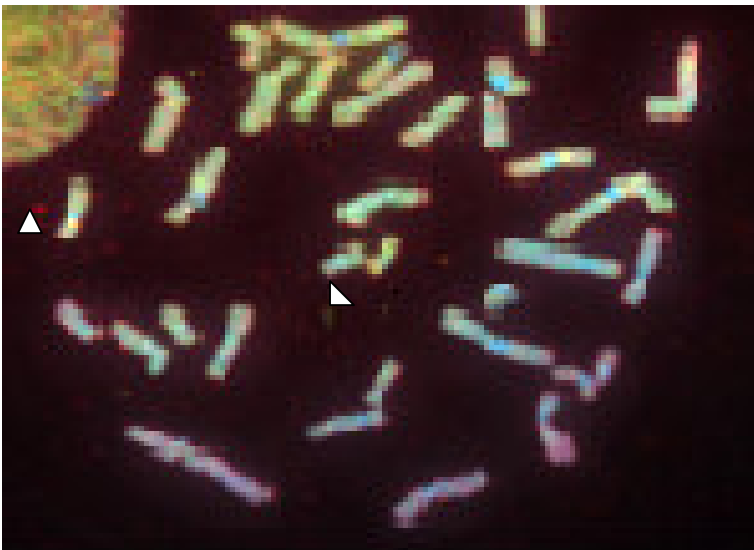
Se lavó la membrana con 900 mL de solución de SSC 2X y SDS 1% a 68°C por 3 veces. Se lavó con 900 mL de solución de SSC 0.1X y SDS 0.5% a 68°C, por último se lavó con 900 mL de solución SSC 2X a temperatura ambiente y se colocó la membrana en un casete con pantalla intensificadora durante 3 días para su revelado.

La imagen de la membrana se capturó con un escáner de radiactividad Storm 680, Molecular Dynamics, Inc y se definieron los perfiles de expresión con los programas “AtlasImagen 2.0, Cluster y TreeView” (Atlas <sup>TM</sup> cDNA Expresión Arrays, Clontech Inc.).

## **RESULTADOS**

Se analizó mediante las tres técnicas una muestra tumoral tipificada como ductal en etapa III, correspondiente a una mujer mexicana con 45 años de edad. Primero se analizó con CESH, después por CGH, por último con microarreglos y se confrontaron los datos.

- En la tab. 1 se indican el No. de metafases seleccionadas por criterios de visibilidad homogénea, es decir, observadas las imágenes (ver IMAGEN 1) al microscopio de fluorescencia que contiene filtros tricromáticos, no deben presentar grumos, deben tener un revelado no opaco y lo más uniformemente visibles. A través de la exploración, la cariotipificación y el análisis posterior de dos laminillas en metafase, hibridadas con RNA y con DNA respectivamente, se identificó en cada grupo de metafases un número de 5 cromosomas alterados en CESH y 6 cromosomas alterados para CGH. Cada par cromosómico analizado tiene un promedio de cromosomas seleccionados, puede verse que la dotación diploide en ninguno de ellos se completó, debido al criterio antes mencionado.



**IMAGEN 1. Micrografía de 1 metafase obtenida mediante CGH.** La integración de los 3 filtros en CGH asigna puntos de coloración en cada cromosoma hibridado con el DNA no afectado y el DNA neoplásico. Obsérvese algunos grumos rojos y verdes señalados (puntas de flecha blancas).

**TABLA 1.** Número de metafases seleccionadas.

TECNICA	NO. DE METAFASES SELECCIONADAS	PAR CROMOSÓMICO CON ALTERACIONES	NO. DE CROMOSOMAS SELECCIONADOS (n)
CESH	14	1	17
		3	22
		4	13
		9	21
		16	25
CGH	27	1	35
		3	37
		4	41
		5	41
		13	47
		16	45

(n) Representa el número promedio de cromosomas, seleccionándose cromosoma por cromosoma. Aunque algunas metafases dieron positivo en la hibridación para seleccionar su estado diploide, nótese que no se completó.

En la tabla 2 se presentan los resultados de CESH. La relación de sobreexpresión corresponde a la estandarización de fluorescencia superior al rango 1.2. Obsérvese que los intervalos de sobreexpresión de genes varían de una forma cualitativa, dependiendo de la subregión cromosómica alterada y por consiguiente del gen o genes afectados de los cromosomas 1, 3, 4, 9 y 16, (ver figura 1A). La técnica no localizó regiones con subexpresión o baja expresión en la columna de aberraciones, éste rango se da abajo de la estandarización de fluorescencia menor al rango de 0.8.

**TABLA 2** Regiones sobreexpresadas evidenciadas por CESH.

	<b>CROMOSOMA</b>	<b>ABERRACIÓN</b>	<b>REGIÓN</b>	<b>GENES</b>
<b>CESH</b>	1	SOBREEXPRESIÓN	1p13-q21	NOTCH 2 CLK2
	3	SOBREEXPRESIÓN	3p11-p12	IL12A
	4	SOBREEXPRESIÓN	4q31	IL15 Ciclina A
	9	SOBREEXPRESIÓN	9q11-q13	PDGFA
	16	SOBREEXPRESIÓN	16q11.1-q11.2	?

\*Sobreexpresión: medida estándar relacionada con la duplicación o amplificación de mecanismos genómicos, diferente de la duplicación de DNA genómico es decir, hay sobreproducción fuera de lo común de RNAm.

(p) brazo superior de un cromosoma.

(q) brazo inferior de un cromosoma

(?) No hay genes responsables de tumorigénesis. En duda.

La tabla 3 muestra por medio de CGH la detección de 7 regiones cromosómicas, 5 ganancias y dos pérdidas en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 13 y 16, con los genes pertenecientes a ellos. Al igual que las regiones representadas en la tabla de CESH, reflejan intervalos en un rango cualitativo en longitud similar para cada subregión, (comparar la figura 1A). En este caso se considera como pérdida de una región cromosómica conforme a la estandarización fluorescente menor del límite 0.8, y como duplicación o ganancia de material cromosómico de un porción cromosómica relativa al estándar de fluorescencia superior al límite de 1.2.

**TABLA 3** Regiones con alteraciones cromosómicas obtenidos con CGH

	<b>CROMOSOMA</b>	<b>ABERRACIÓN</b>	<b>REGIÓN</b>	<b>GENES</b>
<b>CGH</b>	1	PÉRDIDA	1p35-p36.1	BRCD2
		DUPLICACIÓN	1p13-q12	NOTCH 2
	3	DUPLICACION	3p12-q11.2	IL12A
	4	DUPLICACIÓN	4q28	Ciclina A
	5	DUPLICACIÓN	5q14-q23	LERK-7
	13	DUPLICACIÓN	13q21	?
	16	PÉRDIDA	16p11.2-p13.1	TNFRSF17

Pérdida: falta de un fragmento cromosómico relacionado al límite de fluorescencia menor a 0.8

Duplicación: ganancia de un fragmento cromosómico relacionado al límite de fluorescencia superior a 1.2.

(p) brazo superior de un cromosoma.

(q) brazo inferior de un cromosoma.

(?) no hay genes representativos de tumorigénesis. En duda.



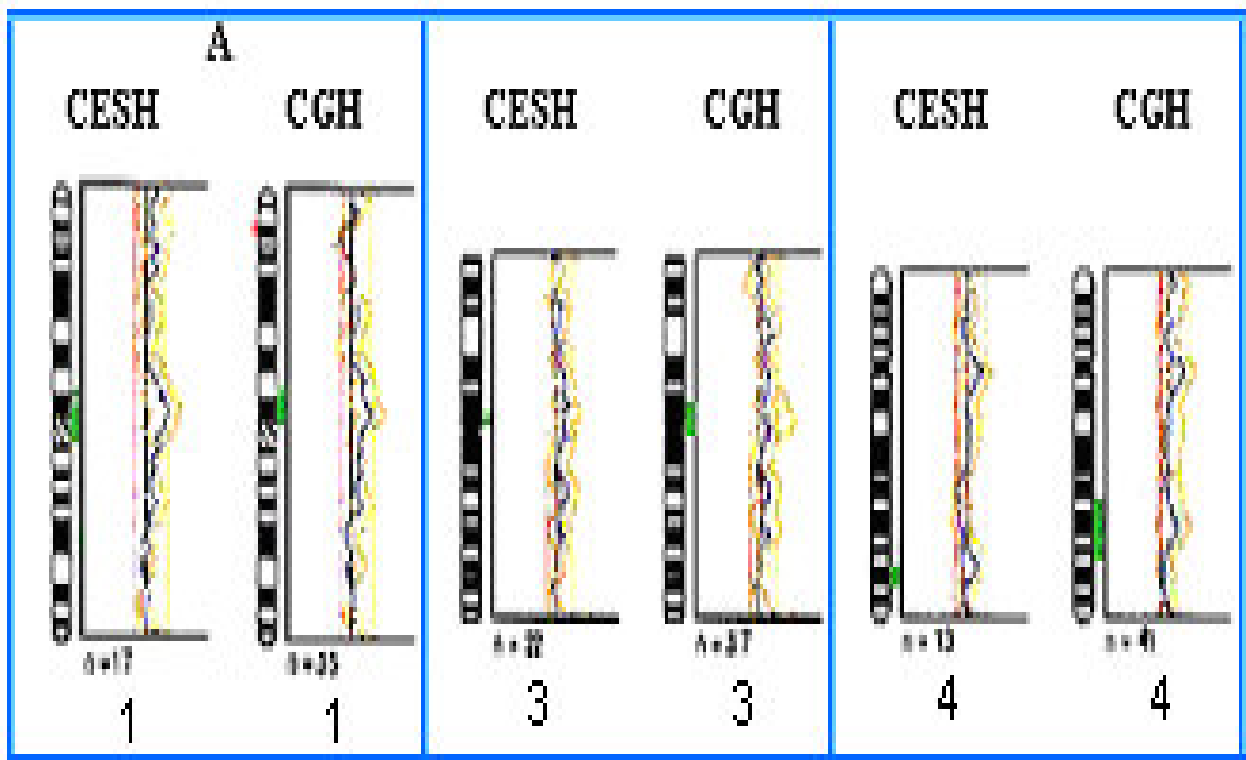
La tabla 4 resume la expresión de algunos genes con su respectiva localización en el cromosoma, detectados con el análisis de microarreglos, de los cuales 14 se encuentran sobreexpresados y solo 3 subexpresados. Se considera sobreexpresión al grado de hibridación que rebasa el límite estándar de 2.5, mientras que se denomina subexpresión al grado que disminuye del límite estándar  $-2.5$ . Considerando al grado de hibridación como el número relativo de moléculas de RNAm. Los genes seleccionados en esta tabla son representativos en la tumorigénesis, cada uno de ellos tiene un papel importante en la regulación de las funciones celulares no cancerosas. A grosso modo 2 de ellos pertenecen al ciclo celular, 4 efector moduladores, 3 son factores de crecimiento, 2 son receptores, 7 oncosupresores, 1 interleucina y 1 proteína asociada a la familia bcl, algunos de ellos poseen más funciones.

**TABLA 4** Expresión de algunos genes obtenidos por análisis con microarreglos.

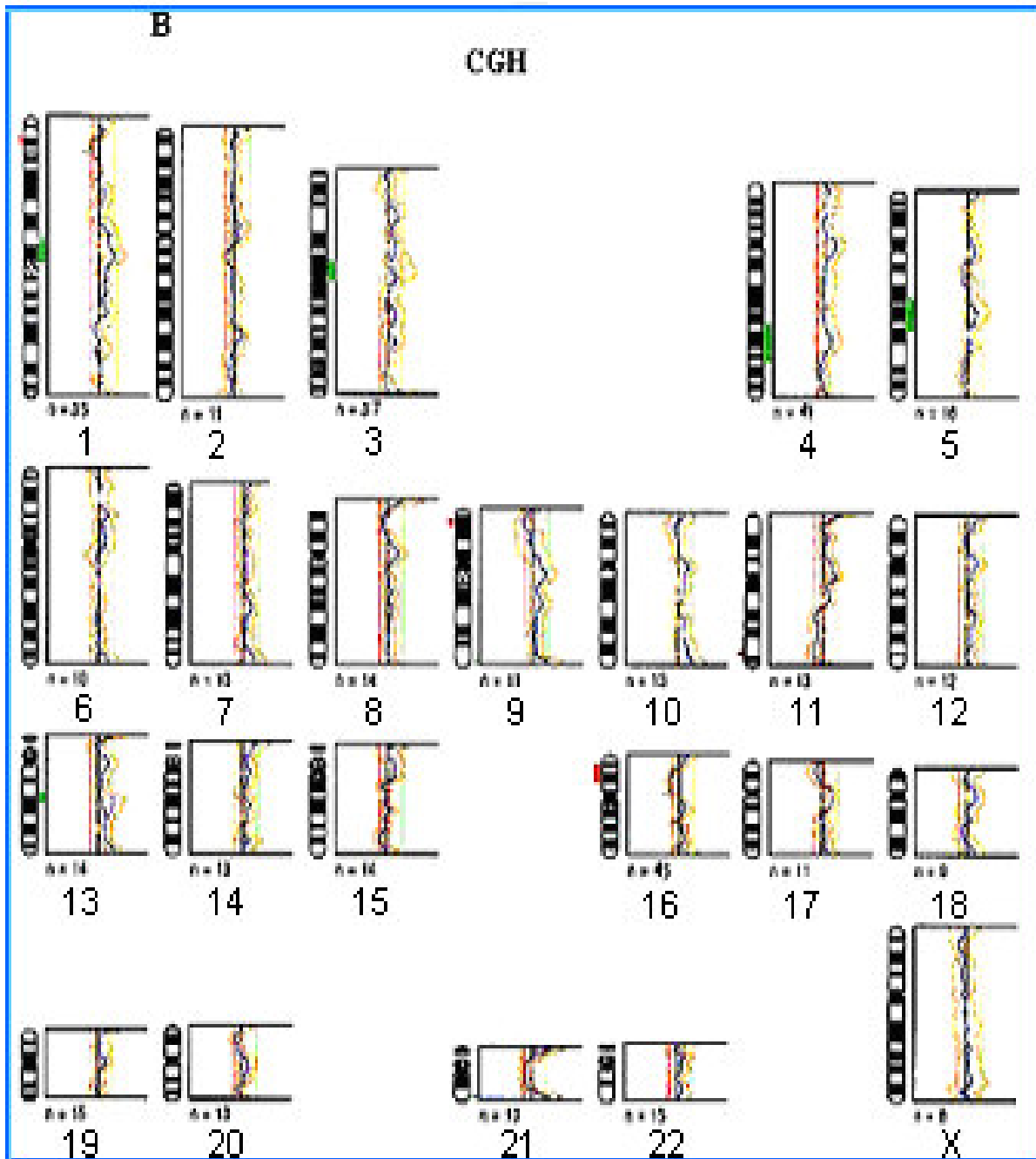
<b>CROMOSOMA</b>	<b>NIVEL DE EXPRESIÓN</b>	<b>REGIÓN</b>	<b>GENES</b>
1	SOBREENPRESIÓN	1p36.1 1p36 1p35.3 1p35-p36.1 1p11-p13 1q21	CHC1 EPHA2 SFN EPHB2 NOTCH 2 CLK2
	SUBEXPRESIÓN	1q21	MCL1
3	SOBREENPRESIÓN	3p12-q13.2	IL12A
4	SUBEXPRESIÓN	4p13	RHOA
	SOBREENPRESIÓN	4q28-q31	Ciclina A
6	SOBREENPRESIÓN	6q25-q26	ezrin
9	SOBREENPRESIÓN	9q11-q13	PDGFA
11	SUBEXPRESIÓN	11p15.5	P57
13	SOBREENPRESIÓN	13q12.3	BRCA2
16	SOBREENPRESIÓN	16p13.1	TP53
17	SOBREENPRESIÓN	17q12-q21	ERBB2
19	SOBREENPRESIÓN	19p13.2	JunD proto- oncogén

La región indica la posición relativa del gen.

En la figura 1A se presentan las similitudes y diferencias entre intervalos del perfil de la expresión y el perfil genómico, en los cromosomas 1, 3 y 4 respectivamente. Se puede inferir también que la diferencia es substancial y aproximadamente igual en magnitud, la razón de sus proporciones son similares. Observe el perfil del cromosoma 1 en CESH mayor que el cromosoma 1 de CGH cerca de la región centromérica, y viceversa los dos cromosomas 3, además las subregiones de 1p<sup>-</sup> (región de p con pérdida) no detectado en CESH. En la figura 1B se presenta el análisis por CGH, obsérvese el cromosoma 16 con pérdida de la región 16p11.2-p13.1.



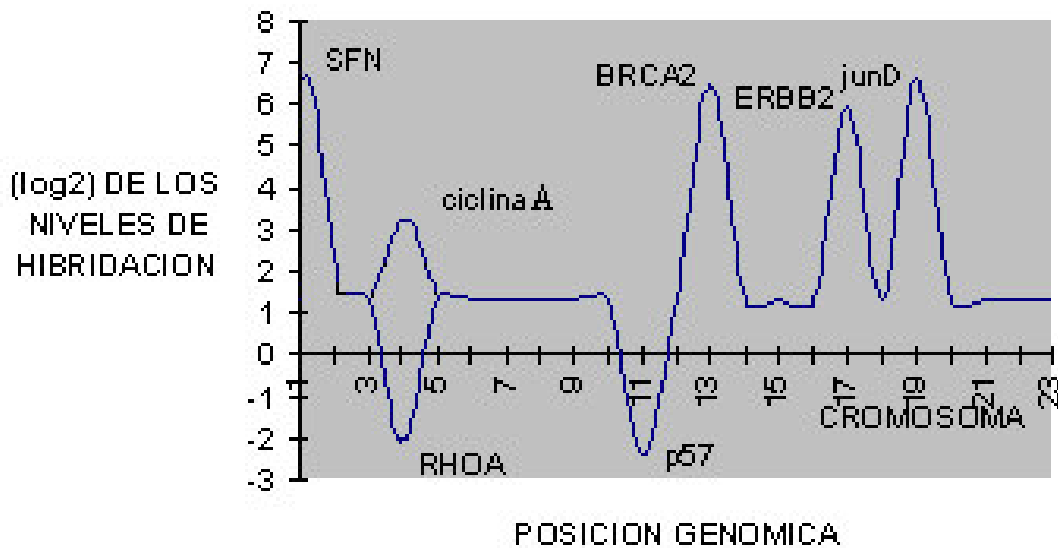
**FIGURA 1A. Comparación de los perfiles de expresión y genómico.** Cada ideograma compara las regiones sobreexpresadas en verde por CESH de los cromosomas 1, 3, y 4 y mediante CGH las regiones con ganancias en verde y con pérdidas en rojo, señaladas en pequeñas barras al un lado del cromosoma afectado, asociado a su respectivo perfil de radio-fluorescencia en las gráficas. Superior al límite de 1.2 sobreexpresión y ganancia para cada una, mientras que el límite inferior de 0.8 una pérdida solo en CGH.



**FIGURA 1B. Análisis completo mediante CGH.** Se muestra el perfil obtenido, en la relación por radio-fluorescencia, inferior al límite de 0.8 al lado izquierdo de las gráficas representa una pérdida, 1p35-p36.1 y 16p11.2-p13.1 y del lado derecho superior al límite de 1.2, ganancias en 1p13-q12, 3p12-q11.2, 4q28 y 13q21.

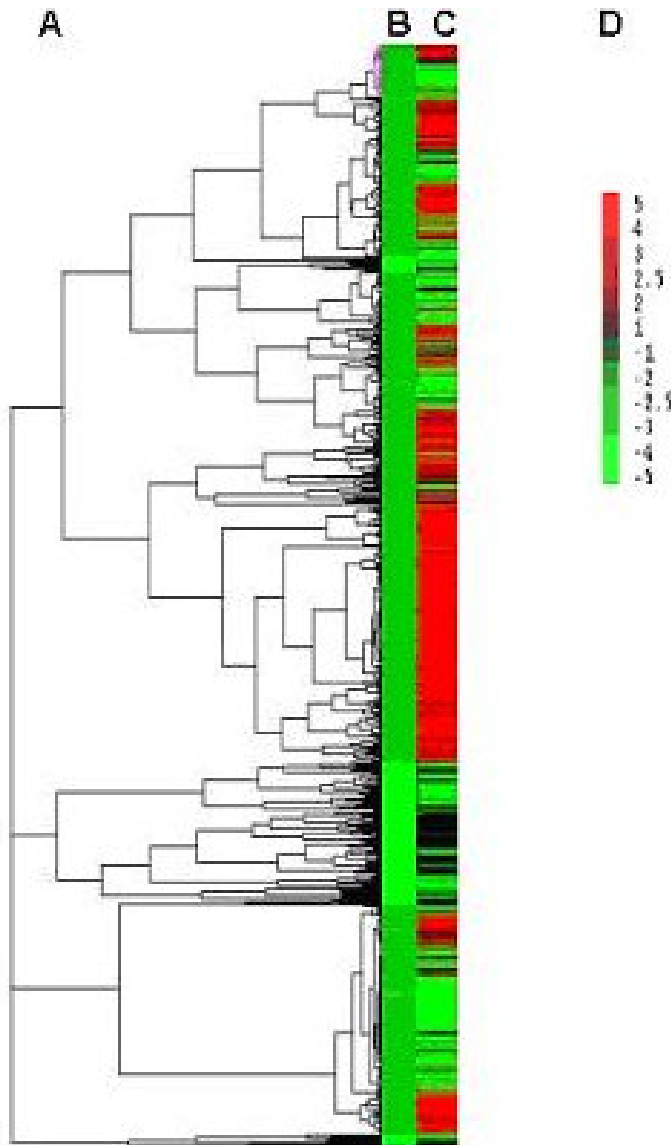
La figura 2 expone los grados de expresión de genes importantes en el cáncer identificados con microarreglos de cDNA. Los perfiles de expresión obtenidos por la intensidad de hibridación de la membrana se transformaron en logaritmo base 2.

### NIVELES DE EXPRESION POSICIONAL



**FIGURA 2. Gráfica relativa entre la posición genómica y sus niveles de expresión en base logaritmica2.** Niveles de expresión de los genes importantes en la tumorigénesis; SFN, Ciclina A, RHOA, p57, BRCA2, ERBB2 y JunD, generados en microarreglos, los picos debajo de -1 indican subexpresión y superiores a 1 sobreexpresión. El eje de las abscisas corresponde al número de cromosoma.

En la figura 3 se realiza una comparación de los dos ejemplos estudiados con un dendrograma por relación de funciones genéticas, generado por microarreglos de cDNA con los programas de cómputo Cluster y TreeView.



**FIGURA 3** Análisis de los patrones de expresión generados por microarreglos. Gráfica del análisis representativo de los patrones de expresión genética, por homologías de funciones (A), del ejemplo no tumoral (B) y del tumor (C), así como sus valores numéricos en (D). El color rojo indica sobreexpresión, en negro subexpresión y en verde la expresión normal.

→ → Examinando los datos contenidos en la tabla 5 se deducen tres genes cuya actividad coincide con las tres técnicas, mientras otros dos solo coinciden entre CESH y Microarreglos. Y en la figura 4 se muestra el resultado de hibridación en la membrana de microarreglos para la Ciclina A, el dato más consistente evidenciado por las tres técnicas referidas.

**TABLA 5** Identificación de Genes amplificados y sobreexpresados mediante las tres técnicas utilizadas en este trabajo.

GENES IDENTIFICADOS	CGH	CESH	MICROARREGLOS
NOTCH 2	+	+	+
IL12A	+	+	+
Ciclina A	+	+	+
PDGFA		+	+
CLK2		+	+

(+) identificación positiva



**FIGURA 4.** Resultado de hibridación de cDNA marcado con  $\acute{O}P^{32}$  de la Ciclina A en la membrana de microarreglos. Se muestra el perfil radio-hibridación por la intensidad de la mancha radioactiva en un verde tenue, proporcional al grado de hibridación.

## **DISCUSIÓN**

Kallioniemi A y colaboradores (1992), mediante el uso de dos genomas fluoromarcados hibridados simultáneamente en cromosomas metafásicos, logran determinar pérdidas, ganancias y amplificaciones intra cromosómicos de células tumorales; por razón del registro de la frecuencia relativa de los perfiles de hibridación genómica, manejando un estándar radio fluorescente uno, como correspondencia de dos copias de la secuencia, estableciendo que las secuencias con amplificación pueden contener oncogenes, e igualmente las deleciones contener genes supresores de tumor. El tumor de tipificación ductal analizado tiene características histopatológicas de numerosas mitosis, al examinarse mediante 2 métodos citogenéticos encontramos 2 regiones genómicas con genes supresores de tumor, una pérdida y la otra sobreexpresada en 1p<sup>-</sup> encontrándose BRCD2 y SFN respectivamente suscitando controversia en el sentido de que uno de ellos se haya amplificado. Jorma J. Isola y colaboradores (1995) al investigar el número de aberraciones genéticas en cáncer de mama nodo-negativo consideran que, dependiendo de la cantidad de aberraciones contenidas en termino medio; tres pérdidas, tres por aumento del número de copias, y para otro tipo de aberraciones siete, es al grado de malignidad y progresión tumoral, independientemente del tamaño del tumor. Ello unido a la importancia de un buen o mal pronostico clínico. El número de aberraciones identificadas concuerda, detectándose 5 ganancias y 2 pérdidas, si bien, como lo indica Valladares A., *et al.*, (2004) en su estudio, es una cifra menor a lo esperado, encontrando de 6 a 10 por ejemplar. No necesariamente deben existir una gran cantidad de genes afectados para el inicio o progresión cancerosa, con uno basta para cualquier reacción de la célula o tejido afectado.

Peter Lichter y colaboradores (2000) aparte de realizar un estudio detallado sobre la resolución, deficiencias y criterios alternativos para la aplicación y optimización técnica de la Hibridación Genómica Comparativa; presentan evidencias de que al complementar con Microarreglos de CGH y otros protocolos, tales perfiles genéticos, además de ser útiles en la clasificación tumoral, haría posible asociarlos con la localización anatómica de la célula respectivamente transformada. Con base a estas tendencias antedichas, una prueba piloto realizada en 38 líneas celulares de cáncer mamario por Forozaan F. y sus colegas en el 2000, analizan la importancia de estudiar mediante CGH, FISH y microarreglos de cDNA por



fluorescencia, concluyendo sobre el grado de perfección para las diversas alteraciones encontradas en estas líneas celulares se configuran mejor a través de una aplicación paralela y alternada con tecnología de microarreglos.

Sin embargo Yong-J. y colaboradores (2001) recomiendan que, una especificación más precisa; al comparar estos resultados mediante un sistema similar, basado ahora en el marcaje de dos sondas derivadas de RNA, cohibridadas en extendidos de cromosomas normales en metafase, evidenciando las inestabilidades por subexpresión o sobreexpresión a nivel de localización del RNA claramente en su sitio de transcripción en el cromosoma, y cotejar genes importantes en la Carcinogenesis, equivalente a la técnica extendida por Kallioniemi A y colaboradores, a la par de una revisión minuciosa de estos modelos de expresión, a través del análisis sistemático de muchos genes por metodologías de Microarreglos; proporcionando datos complementarios sobre los patrones de expresión en varios ejemplos de tejido normal y de tumor. Al Observar una mejor definición en el panorama obtenido por medio de hibridación de secuencias de expresión comparada (CESH), llegaron a la conclusión —de si bien es verdad, los perfiles de ambas técnicas CGH y CESH son similares, sus patrones de hibridación por lógica, difieren. Y por el grado de sondeo de la técnica referente; aparte, de su potencialidad como herramienta para la clasificación de tumores a través de sus perfiles de expresión, CESH puede ser muy útil para explorar genes involucrados en la diferenciación de tejidos y la embriogénesis—. Los resultados obtenidos mediante las 3 técnicas fueron semejantes, encontramos alteraciones previamente reportadas en otros estudios como en  $1p^+$ ,  $1q^+$ ,  $1p^-$ ,  $3p^+$ ,  $4q^+$ ,  $9q^+$ ,  $13q^+$ ,  $16p^-$ ,  $17q^+$  y  $19p^+$ , a pesar de ello encontramos varias inconsistencias al compararlas.

En este trabajo es notorio que cada una de las técnicas evidenció corolarios similares, lo bueno de validar con metodologías de CESH y microarreglos son sus enfoques de cada una, obteniendo mejores resultados al integrarse:

- Con las tres técnicas de hibridación se identificaron regiones amplificadas que concuerdan con la sobreexpresión de genes ubicados al mismo nivel como el gen NOTCH 2 un oncosupresor, relacionado con a factores de crecimiento, receptores de quimiocinas y otros. La Ciclina A, es uno de los datos más consistentes demostrados por las tres metodologías referidas, de actividad específica en la

mitosis. Además el gen IL12A, que es un factor inductor de maduración citotóxica linfocítica interferón interleucinas.

- Por las técnicas de expresión se revelaron a los genes PDGFA referente con factor de crecimiento, citocinas y quimiocinas, y CLK2 afín con la regulación del ciclo celular mediado por quinasas. Indudablemente la sobreexpresión de estos está dada por mecanismos distintos a la amplificación. Debido a ello CGH no detecto los cambios a nivel cromosómico.
- Si bien, la delección y la duplicación obtenidas con CGH en 1p, es corroborada por una amplia variedad de estudios, (Isola J. *et al.*, 1995; An H. *et al.*, 1999; Forozaan F. *et al.*, 2000; y varios más), y la sobreexpresión mostrada con CESH es reflejada en forma notoria por las duplicaciones puntualizadas en CGH, no obstante los casos donde CGH involucra pérdidas de segmentos cromosómicos CESH no lo percibe.
- Las características generadas por los perfiles de expresión tanto de CESH como de microarreglos se corresponden entre ambos a los datos generados, a pesar de ello la mayor parte de estos fueron especificados por microarreglos; de ellos los más significativos son RHOA, p57, ERBB2, BRCA2 Y JunD.
- Pese a la valiosa cantidad fundamentada por microarreglos (ver fig. 2 y 3) su mayor limitante es el número de genes contenidos en la membrana. Situación superada por las otras dos metodologías, al definir en forma global otras posibles regiones genéticas que pudieran estar involucradas en la transformación oncogénica, sin embargo, su mayor limitante es la sensibilidad de la secuencia genética a encontrar, ya que en su mayoría pertenecen al orden de 1Mb como diversos trabajos lo demuestran entre ellos el de Collins C. y su grupo en el 2001.

El trabajo comparativo de los resultados procedentes de una misma muestra, mediante varios métodos, puede ser muy pesado y difícil a la hora de las interpretaciones.

¿Es cuestionable la exactitud de un procedimiento respecto al grado de incertidumbre de los elementos a detectar? Como se ha venido observando a través de los límites de resolución de cada una de las técnicas, así como de las inconsistencias puntualizadas al compararlas, es lógico suponer que posiblemente los elementos no detectados obedezcan a mecanismos

distintos a la amplificación o que de alguna forma sean enmascaradas en los procesos de sobreexpresión o ausencia de ella.

¿Qué beneficio representa un resultado aproximado, cuyo nivel de comprobación monitorea en forma global el problema? En este aspecto es muy valiosa la información generada por un método como CGH o CESH, ya que exploran en la totalidad del genoma a investigar, y como se ha definido con anterioridad la diversidad anómala del conjunto cromosómico en un tejido canceroso, y que inclusive varía de célula a célula del mismo. En este sentido, sin la ayuda de estas dos metodologías, sería prácticamente imposible detectar con estudios que requieren el uso de marcadores genéticos, que definen con mayor exactitud el comportamiento disfuncional del gen o grupo de genes involucrados en la patología oncológica.

En conclusión, ninguna de las tres metodologías es perfectamente satisfactoria, además se requiere que las fronteras de ellas se mejoren y refinen, y en función de los datos obtenidos, ningún razonamiento descarte la de otros y sea integrativo.

Evidentemente los desequilibrios cromosómicos contenidos en células de tumor de mama esporádicos demostrados por la Hibridación Genómica Comparativa, la Hibridación Comparativa de Secuencias de Expresión y el análisis con microarreglos expresan un cierto orden del estado de complejidad en la conducta de la célula cancerosa al revelar pérdidas y ganancias del material genético, medidas de transcripción por abajo o arriba del curso normal, que pueden contener la codificación de oncogenes y genes supresores de tumor, y mediante el número de aberraciones observadas definir una prognosis amplia e individual para cada paciente.

Al margen de los datos obtenidos en el presente trabajo se considera permisible puntualizar y determinar ciertas particularidades relevantes, y de alguna forma válidos, para una clasificación tumoral en un marco molecular de la posible actividad neoplásica en células de mama, al explorar los cambios intra-cromosómicos en toda la longitud del genoma, y el entendimiento de los mecanismos suprayacentes que rompen la regulación y función normal de la célula. Sin embargo, tomando en cuenta el grado de resolución de las técnicas, y para obtener los cambios o variaciones reales en la estructura y función genómica, es necesario alternar con otros métodos de estudio analíticos que establezcan con

mayor amplitud la interacción de dichas modificaciones, aclarando así, a nivel celular y molecular los mecanismos que dirigen y regulan la transformación oncogénica tejido-especifica, al mismo tiempo generar un estudio detallado de esos cambios significativos en el pool genético, permitiendo inclusive en función de los datos obtenidos las condiciones idóneas para la aplicación de un tratamiento a nivel molecular en algunos tumores malignos, como propuesta alternativa para dicho tratamiento, entre ellas la terapia génica ya iniciada hace algunos años.

## **CONCLUSIONES**

A través del presente trabajo, se intento describir un panorama aproximado de los avances en la lucha contra el cáncer. Aunque se alcanzaron adecuadamente los objetivos, su solución no fue 100% satisfactoria, en el aspecto de generar un enfoque más amplio del estado y función celular oncogénico en la medida de la estructura genómica alterada y, queda la incógnita de las inconsistencias observadas en los datos precisados por cada método.

Los estudios de laboratorio, en particular los mencionados en este trabajo, sin excluir algunos que no mencione y que son de tecnología de punta como SAGE (Análisis Serial de Expresión Genómica), FISH-multicolor, por mencionar algunos, son de gran ayuda en el estudio y diagnostico en los pacientes en la mayoría de los hospitales en los países de primer mundo.

Es de señalar que este estudio es uno de los primeros en realizar una nueva metodología como es la de CESH, en cáncer de mama no hereditario en nuestro país.

## **GLOSARIO**

**Adenopatías:** afecciones particulares de los ganglios linfáticos.

**Agente inductor:** intensificador indirecto de la transformación celular.

**Amplificación:** copias de una secuencia génica adicional.

**Aneuploidias:** dotación anormal de cromosomas.

**Angiogénesis:** desarrollo de nuevas redes endoteliales.

**Apoptosis:** muerte celular programada.

**Biochip:** microchip a base miles de secuencias génicas conocidas.

**Blastoma:** indica germen de tumor.

**Carcinógeno:** puede ser un agente biológico, físico o químico capaz de alterar la estructura del DNA, e iniciar el cáncer.

**Cariotipos:** ordenamiento descriptivo de los cromosomas por pares homólogos.

**cDNA:** DNA sintetizado a partir de mRNA.

**Co-hibridación:** hibridación simultánea.

**Cromosoma Filadelfia:** pérdida de material en el brazo largo de un cromosoma del grupo G.

**Ductal:** referente a los conductos lactíferos de la glándula mamaria femenina.

**Fluorescencia:** es el fenómeno de emisión de radiación de un cuerpo después de la absorción fotónica.

**Genes supresores de tumor:** las proteínas de estos genes regulan negativamente el ciclo Celular.

**Hibridación:** es la formación complementaria bicatenaria de origen diferente.

**Ideograma:** modelo simbólico estilizado respecto a la forma original.

**Lobulillar:** unidad mas pequeña dispuesta en forma de racimo que forma los lóbulos de la glándula mamaria femenina.

**Monitoreo molecular:** herramienta que permite hacer una detección a nivel molecular.

**Nanotecnología:** desarrollo de la tecnología a nivel de una mil millonésima parte.

**Neoformación:** formación de nuevos tejidos.

**Oncogén:** son las versiones alteradas de los protooncogenes.

**Protooncogén:** gen celular normal que codifica una proteína que interviene en la Regulación del ciclo celular.

**Transcriptoma:** total de mRNA de una célula en un intervalo dado.

**Transcrito:** molécula de RNA sintetizada.

**Tumorigénesis:** origen o principio de un tumor.

## **GLOSARIO DE TERMINOS**

**BRCA2:** gen de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2 Oncogen y Tumor Supresor

Reparación de Daño en DNA Proteínas y Ligasas

**CHC1:** proteína 1 de la condensación cromosómica; regulador de la condensación cromosómica 1 (RCC1)

Otras Proteínas del Ciclo Celular

**Ciclina A:** Ciclina específica de la mitosis (CCNA; CCN1)

**CLK2:** cinasa asociada a CDC 2; cinasa reguladora del ciclo celular

Miembros de la red de cinasas intracelulares

**EPHA2:** cinasa epitelial celular (ECK) Transductor Intracelular, Efector y Modulador

Factor de Crecimiento y Receptor de Quimiocinas

Proteína Receptora cinasa

**EPHB2:** efrin receptor B2; regulador en el desarrollo eph-relacionado tirosina cinasa

(DRT); eph tirosina cinasa 3

(EPHT3); HEK5; elk-relacionado a tirosina cinasa (ERK)

Transductor Intracelular, Efector y Modulador

Factor de Crecimiento y Receptor de Quimiocinas

Proteína Receptora cinasa

**erbb2:** proto-oncogén; neu protooncogén; HER2 Oncogén y Tumor Supresor

Transductor Intracelular rs, Efector y Modulador

Factor de Crecimiento y Receptor de Quimiocinas ; Proteína Receptora cinasa

**Ezrin:** MOESIN-radixin-asociada proteína (MERLIN); schwannomin (SCH);

neurofibromatosis 2 (NF2)

Oncogén y Tumor Supresor

Transductor Intracelular, Efector y Modulador

**IL12A:** interleucina 12 subunidad alfa (IL12-alpha); factor de maduración limfotóxica

subunidad 35-kDa (CLMF p35); NK factor celular estimulador subunidad 1 (NKSF1)

Interleucina e Interferón

**junD proto-oncogén:** Oncogén y Tumor Supresor

Activador y Represor en la Transcripción

Transductor Intracelular, Efector y Modulador



**MCL1:** proteína celular de la leucemia mieloide 1 Familia de Proteínas Bcl

**NOTCH2:** Notch homólogo tipo 2 Oncogén y Tumor Supresor

Factor de Crecimiento y Receptor de Quimiocinas

Otros Receptores (por sus Actividades)

**p57:** ciclina-dependiente de cinasa inhibidor 1C (CDKN1C); KIP2 CDK Inhibidor

Activador e Inhibidor cinasa

Oncogén y Tumor Supresor

**PDGFA:** Factor de Crecimiento derivado de plaquetas subunidad A( PDGF1) Factor de Crecimiento, Citocinas y Quimiocinas; factor receptor Activador de plaquetas (PAFR)

Factor de Crecimiento, Citocinas y Quimiocina

**RHOA:** miembro A de la familia de genes ras homólogos (ARHA); aplasia relacionado ras- homólogos 12 (ARH12; RHOH12)

Oncogén y Tumor Supresor

Proteínas G

**SFN:** estratifin; 14-3-3 proteína sigma; marcador celular epitelial

proteína 1; HME1

Activador e Inhibidor cinasa

Oncogén y Tumor Supresor

**TP53BP1:** proteína tumoral 53-ligada 1 Otras Proteínas Asociadas a la Apoptosis



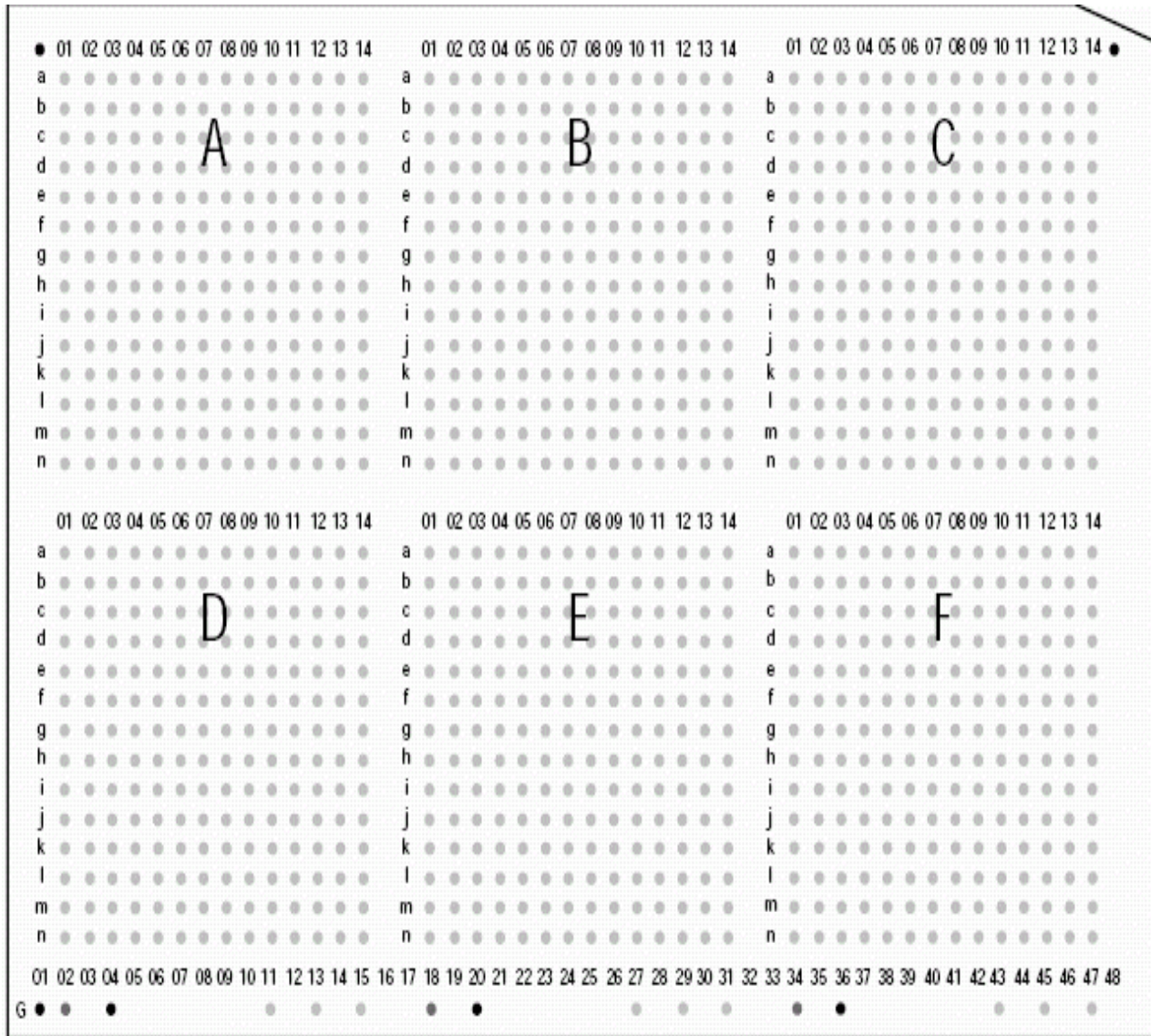
## **ANEXO I agrupamiento jerárquico.**

Datos basados en trabajos realizados por Eisen y colaboradores en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* encontraron una consistencia eficaz para agrupar la expresión de genes por funciones similares encontrándose una tendencia similar en humanos.

Se menciona que la base natural para organizar los datos de expresión de los genes es agruparlos con los modelos similares de expresión, estableciendo una descripción matemática de tal similitud. Medidas tales como la distancia euclidiana, producto de dos vectores n-dimensionales, etc., pueden usarse para tal efecto. Sin embargo, el agrupamiento jerárquico es el mas utilizado.

El comportamiento de los genes va de acuerdo a la noción intuitiva de lo que significa para dos genes ser “co-expresados”.

**ANEXO II Esquema de la membrana de microarreglos con 1,176 genes, utilizada en este trabajo.**

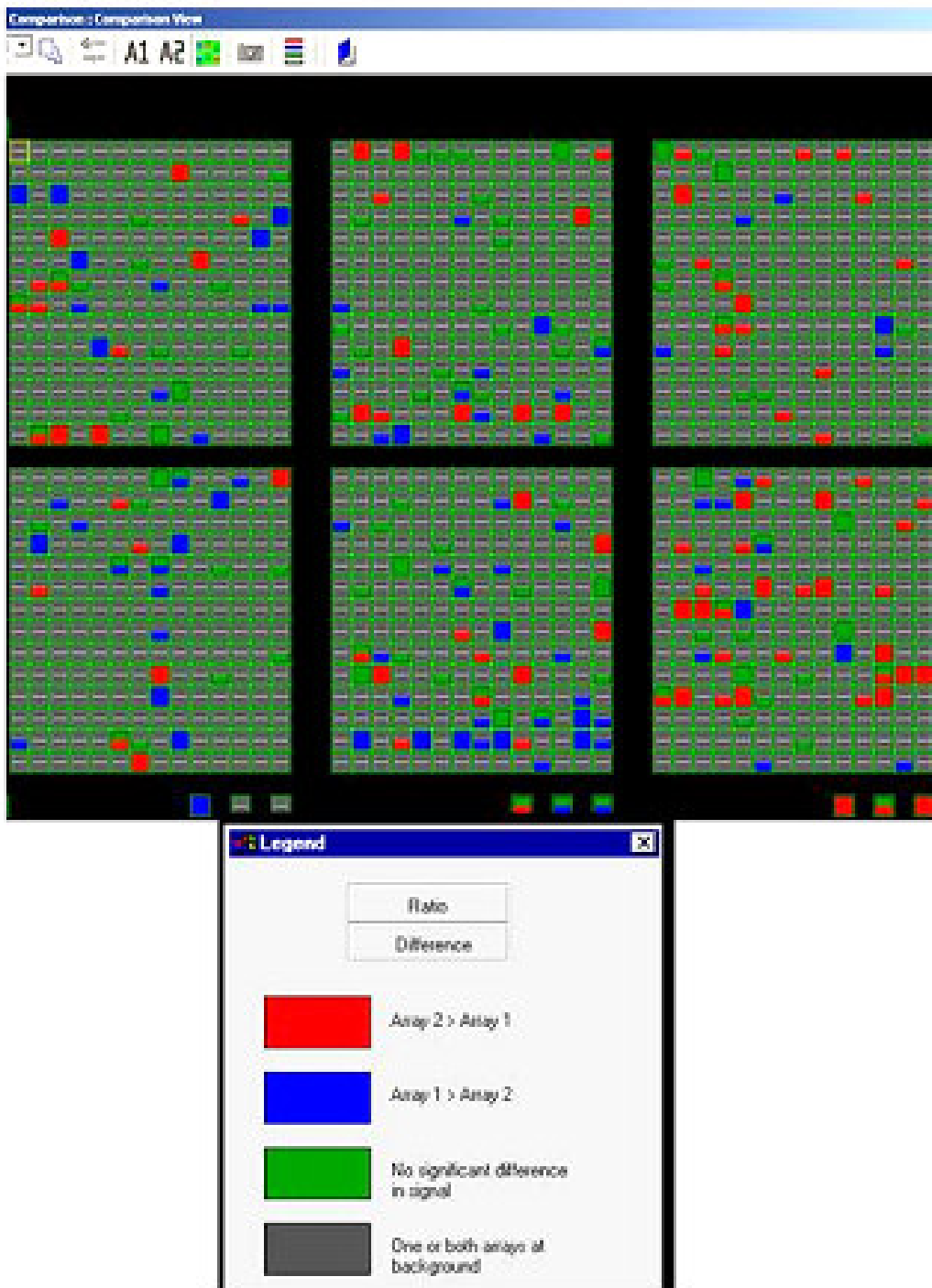


Dark gray dots represent orientation marks to help you determine the coordinates of hybridization signals.

Cada cuadrante representa grupos de genes relacionados por sus funciones celulares como factores de crecimiento, reguladores del ciclo celular, apoptosis, etc.

Las referencias en la parte inferior corresponden a genes “housekeeping”, ribosomales, etc., se toman como controles de hibridación.

### ANEXO III Perfil generado con el programa de cómputo AtlasImage 2.0.



El color rojo evidencia genes sobreexpresados, en verde subexpresados y en gris sin cambios de expresión. (Con permiso de Valladares et al. 2004)

## **BIBLIOGRAFÍA**

- ○ Aaronson J., Eckman B., Blevins R., Borkowsky J., Myerson J., Imran S., Elliston K. Toward the development of a gene index to the human genome: An assessment of the nature of high-throughput EST sequence data. *Genome Research* 1996; 6:829-845.
- ○ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing 1994 4<sup>th</sup> ed.; pp 313-314.
- ○ Allione F., Eisinger F., Parc P., Noguchi T., Sobol H., Birnbaum D. Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 19:181-186.
- ○ An H., Claas A., Savelyeva L., Seitz S., Schlag P., Scherneck S., Schwab M. Two regions of deletion in 9p23-24 in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Research* 1999, 59:3941-3943.
- ○ Arenas D. Tesis de doctorado “Análisis Molecular del Gen de la Distrofia Muscular de Duchenne”, UNAM 1996, pp. 2, 8, 27, 86.
- ○ Atlas cDNA expression arrays user manual. Clontech.
- ○ Baltimore D., Darnell J., Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P. *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company 2000 4<sup>th</sup> ed.; pp 248-251, 1054-1082.
- ○ Bertucci F., Houlgatte R., Benziane A., Granjeaud S., Adelaide J., Tagett R., Loriod B., Jacquemier J., Viens P., Jordan B., Birnbaum D., Nguyen C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Human Molecular Genetics* 2000, 9(20):2981-2991.
- ○ Bieche I., Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chrom Cancer* 1995; 14:227-251.
- ○ Birch J., Hartley A., Tricker K., Prosser J., Condic A., Kelsey A., Harris M., Jones P., Binchy A., Crowther D. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994; 54:1298-1304.
- ○ Bishop M. Oncogenes. *Scientific American* 1982; 246(3):81-92.

- ○ Boletín Practica Medica Efectiva. Instituto Nacional de Salud Pública Cancer de mama. 2001, 3(4).
- ○ Braunwald E., Fauci A., Kasper D., Hauser S., Longo D., Jameson L. Harrison. Principios de medicina interna. ed. Mc Graw-Hill Interamericana 2002; 1: 582, 675-679.
- ○ Brooks bank. C. Wise ways of confronting the cancer genome: gene expression by Microarrays. <http://www.biomednet.com/hmsbeagle>.
- ○ cDNA Cycle Kit Version D Invitrogen, life technologies.
- ○ Cavenee W., Withe R. The Genetic Basis of Cancer. Scientific American 1995; 272(3):72-79.
- ○ Coleman W., Tsongalis G., The Molecular Basis of Human Cancer. Humana Press 2002; 347-363.
- ○ Collins C., Volik S., Kowbel D., Ginzinger D., Ylstra B., Cloutier T., Hawkins T., Predki P., Christopher M., Wernick M., Kuo W., Alberts A., Gray J. Comprehensive Genome Sequence Analysis of a breast Cancer Amplicon. Genome Research 2001, 11(6):1034-1042.
- ○ Collins N., McManus R., Wooster R., Mangion J., Seal S., Lakani S. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. Oncogene 1995; 10:1673-1675.
- ○ Cornelisse C., Kuipers-D., Vliet M., Herman J., Devilee P. Fractional allelic imbalance in human breast cancer increases with tetraploidization and chromosome loss. Int. J. Cancer 1992; 50:544-548.
- ○ Cotran R., Kumar V., Robbins S., Schoen F. Pathologic basis of disease. 5ed. Ed. Saunders. 1994.
- ○ Debuire B., May P. Una proteína, elemento principal de la cancerización. Mundo Científico 1991; 11(117): 1003-1004.
- ○ DeRisi J., Lyer V., Brown P. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression Scale, Science 1997; 278: 680.
- ○ Dorris D., Ramakrishnan R., Trakas D., Dudzik F., Belval R., Zhao C., Nguyen A., Domanus M., Mazumder A. A Highly Reproducible, Linear, and

Automated Sample Preparation Method for DNA Microarrays. *Genome Research* 2002, 12(6):976-984.

○ ○ Dutrillaux B., Gerbault-S., Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990; 49; 203-217.

○ ○ Eisen M., Spellman P., Brown P., Bolyen D. Cluster Analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95 (25):14863-14868.

○ ○ Fearon E., por Abeloff M., Niederhuber J., Lichter A. *Clinical Oncology*, ed. Churchill Livingstone 2000 2<sup>th</sup>. pp 77-84.

○ ○ Forozan F., Mahlamäki E., Monni O., Chen Y., Veldman R., Jiang Y., Gooden G., Ethier S., Kallioniemi A., Kallioniemi O. Comparative Genomic Hybridization Analysis of 38 Breast Cancer Cell lines : A basis for interpreting Complementary DNA Microarray Data. *Cancer Research* 2000, 60:4519-4524.

○ ○ Futreal P., Liu Q., Shattuck-E., Cochran C., Harshman K., Tavtigian S., Bennet L., Haugen-S., Swenson S., Miki Y.. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; 266:120-122.

○ ○ Gariglio P., Orozco F. *Genética y Biomedicina Molecular*, ed. Limusa- Noriega editores 2000, pp 181-198.

○ ○ Garnis C., Buys T., Lam W., Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Molecular Cancer* 2004; 3:9.

○ ○ Gershon D. Microarray technology: An array of opportunities. *Nature* 2002; 416:885-891.

○ ○ Gray J., Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):443-452.

○ ○ Guízar J. *Genética Clínica Diagnostico y manejo de las enfermedades hereditarias*, ed. Manual Moderno 2001 3<sup>a</sup> ed. pp. 153-174, 534-535.

○ ○ Hedenfalk I., Ringnér M., Ben-D., Yakhini Z., Chen Y., Chebil G., Ach R., Loman N., Olsson H., Meltzer P., Borg A., Trent J. Molecular Classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(5):2532-2537.



- ○ Holland J., Weichselbaum R., Frei E., Pollock R., Kufe D., Bast R. Cancer Medicine, ed. BC Decker Inc. 2000 5<sup>th</sup> ed.
- ○ Holloway A., Laar R., Tothill R., Bowtell D. Options available – from start to finish- for obtaining data from DNA Microarrays II. Nature Publishing Group 2002, 32 :481-489.
- ○ Iseli C., Stevenson B., de Sousa S., Samaia H., Camargo A., Buetow K., Strausberg R., Simpson A., Bucher P., Jongeneel V. Long-Range Heterogeneity at the 3' Ends of Human mRNAs. Genome Research 2002, 12(7):1068-1074.
- ○ Isola J., Kallioniemi O., Chu L., Fuqua S., Hilsenbeck S., Osborne K., Waldman F. Genetic Aberrations Detected by Comparative Genomic Hybridization Predict Outcome in Node-Negative Breast Cancer. American Journal Pathology 1995, 147 ( 4): 905-911.
- ○ Iwao K., Matoba R., Ueno N., Ando A., Miyoshi Y., Matsubara K., Noguchi S. Kato K. Molecular classification of primary breast tumors possessing distinct prognostic properties. Human Molecular Genetics 2002, 11(2):199-206.
- ○ Iwasa Y., Michor F., Nowak M. Stochastic Tunnels in Evolutionary Dynamics. Genetics 2004, 166(3):1571-1579.
- ○ Kallioniemi A., Kallioniemi O., Sudar D., Rutovitz D., Gray J., Waldman F., Pinkel D. Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumor. Science 1992; 258 : 818-821.
- ○ Kallioniemi A., Kallioniemi O., Piper J., Tanner M., Stokkes T., Chen L., Smith H., Pinkel D., Gray J., Waldman F. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 89:2156-2160.
- ○ Karp G. Biología Celular, ed. McGraw-Hill Interamericana 2001., pp 403-408, 671-700.
- ○ Lichter P., Joos S., Bentz M., Lampel S. Comparative Genomic Hybridization: Uses and Limitations, Seminars in Hematology 2000; 37(4): 348-357.
- ○ Loeb L., Loeb K., Anderson J. Multiple mutations and cancer, Proc Natl Acad Sci 2003, 100(3): 776-781.

- ○ López O., Lazcano E., Tovar V., Hernández M. La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica?. *Salud Pública de México* 1997, 39(4):259-265.
- ○ Maafs E. Prevenir el cáncer, *Información Científica y Tecnológica (CONACYT)* 1993; 15 (201):12-14.
- ○ Mihich E., Feunteun J., Friend S. Thirteenth Annual Pezcoller Symposium Focusing Analytical Tools on Complexity in Cancer, *Cancer Research* 2002; 62: 3883-3887.
- ○ Muleris M., Almeida A., Gerbault M., Malfroy B., Dutrillaux B. Detection of DNA amplification in primary breast carcinomas with homogeneously staining region by a modified comparative genomic hybridization technique. *Genes Chrom Cancer* 1994; 10:160-170.
- ○ Nadeau H., Balling R., Barsh G., Beier D., Brown M., Bucan M., Camper S., Carlson G., Copeland N., Eppig J., Fletcher C., Frankel W., Ganten D., Goldowitz D., Goodnow C., Guenet J., Hicks G., Angelis M., Jackson I., Jacob H., Jenkins N., Johnson D., Justice M., Kay S., Kingsley D., Lehrach H., Magnuson T., Meisler M., Poustka A., Rinchik E., Rossant J., Russell L., Schimenti J., Shiroishi T., Skarnes W., Soriano P., Stanford W., Takahashi J., Wurst W., Zimmer A. Sequence Interpretation: Functional Annotation of Mouse Genome Sequences. *Science* 2001, 291(5507):1251-1255.
- ○ O'Brien T., Bult C., Cremer C., Grunze M., Knowles B., Langowski J., McNally J., Pederson T., Politz J., Pombo A., Schmah G., Spatz J., Driell R. Genome function and Nuclear Architecture: From Gene Expression to Nanoscience. *Genome Research* 2003; 13:1029-1041.
- ○ Pandis N., Jin Y., Gorunova L., Petersson C., Bardi G., Idvall I., Johansson B., Ingvar C., Mandahl N., Mitelman F., Heim S. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chrom Cancer* 1995; 12:173-185.
- ○ Plass C. Cancer epigenomics. *Human Molecular Genetics* 2002, 11(20):2479-2488.

- ○ Resor L., Bowen T., Wynshaw-B. Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis. *Human Molecular Genetics* 2001, 10(7):669-675.
- ○ Romero R., Mainero F. Etapas en el tratamiento del cáncer de mama. *Cuestión Social: Revista Mexicana de Seguridad Social IMSS* 1997, (40):43-49.
- ○ Roylance R., Gorman P., Harris W., Liebmann R., Barnes D., Hanby A., Sheer D. Comparative Genomic Hybridization of Breast Tumors Stratified by Histological Grade Reveals New Insights into the Biological Progression of Breast Cancer. *Cancer Research* 1999, 59:1433-1436.
- ○ Shirley O. *Enfermería Oncológica*. Ed. Mosby 1999, pp. 5-9.
- ○ Solomon E., Borrow J., Goddard A. Chromosome Aberrations and Cancer. *Science* 1991, 254 : 1153-1159.
- ○ Sorlie T., Perou C., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M., Rjin M., Jeffrey S., Thorsen T., Quist H., Matese J., Brown P., Botstein D., Lonning P., Borresen A. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98(19):10869-10874.
- ○ Steel A., Levicky R., Herne T., Tarlou M. Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophys. J.* 2000, 79(2): 972-981.
- ○ Strausberg R., Riggins G., Genome and genetic resources from the Cancer Genome Anatomy Project. *Human Molecular Genetics* 2001, 10(7):663-667.
- ○ Su A., Cooke M., Ching K., Hakak Y., Walker J., Wiltshire T., Orth A., Vega R., Sapinoso L., Moqrich A., Patapoutian A., Hampton G., Schultz P., Hogenesch J. Large scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99(7):4465-4470.
- ○ The chipping forecast. *Supplement to Nat Genet* 1999; 21:1-60.
- ○ Thompson A., Morris R., Wallace M., Wyllie A., Steel C., Carter D., Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 68:64-68.

- ○ Trichopoulos D., Li F., Hunter D. What Causes Cancer?. *Scientific American* 1996, 275 : 80-87.
- ○ Valladares A., Salamanca F., Madrigal-B., Arenas D. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004; 152:63–166.
- ○ Velesculescu V., Bertelsen A. High-throughput gene expression analysis using SAGE. *Reviews research focus* 1998; 3(4):152-159.
- ○ Venter C., Adams M., Myers E., Li P., Mural R., Sutton G., Smith H., Yandell M., Evans C., Holt R., Gocayne J., Amanatides P., Ballew R., Huson D., Russo J., Zhang Q., Kodira C., Zheng X., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P., Zhang J., Gabor G., Nelson C., Broder S., Clark A., Nadeau J., McKusick V., Zinder N., Levine A., Roberts R., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M.,<sup>1</sup> Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-T., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T., Higgins M., Ji R., Ke Z., Ketchum K., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G., Milshina N., Moore H., Naik A., Narayan V., Neelam B., Nusskern D., Rusch D., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Yuan Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong

R., Suh E., Thomas R., Tint N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-D., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J., Guigó R., Campbell M., Sjolander K., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooshep S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-S., Caulk P., Chiang Y., Coyne M., Dahlke C., Deslattes A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A., Zhu X. The Sequence of the Human Genome. *Science* 2001; 291(5507):1304-1351.

○ ○ Vorechovsky I., Luo L., Lindblom A., Negrini M., Webster A., Croce C., Hammarstrom L. ATM mutations in cancer families. *Cancer Research* 1996; 56:4130-4133.

○ ○ Weinberg R. How Cancer Arises. *Scientific American* 1996, 275: 62-70.

○ ○ Whitney A., Diehn M., Popper S., Alizadeh A., Boldrick J., Relman D., Brown P. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(4):1896-1901.

○ ○ Yang H., Hadad H., Alsaker K., Papoutsakis T. A segmental nearest neighbor normalization and gene identification method gives superior results of DNA-array analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(3):1122-1127.

○ ○ Yong-J., Williamson D., Clark J., Wang R., Tiffin N., Skelton L., Gordon T., Williams R., Allan V., Jackman A., Cooper C., Pritchard-J., Shipley J. Comparative expressed sequence hybridization to chromosomes for tumor classification and identification of genomic regions of differential gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98 (16):9197-9202.

- ○ Zhang H., Yu C., Singer B. Cell and Tumor classification using gene expression data: Construction of forest. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003, 100(7):4168-4172.