



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO.

CAMPUS CHAPULTEPEC.

Escuela De Químico Farmacéutico Biólogo.
Con Estudios Incorporados a la UNAM

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS
ISOFORMAS L Y S DEL GEN MCL-1 EN
CÁNCER DE MAMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
MIRYAM GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Dir. de Tesis: **M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER**
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

Mexico D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER

VOCAL: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SECRETARIO: Q.F.B. GERARDO GARCÍA CAMACHO

1er. SUPLENTE: M. EDUARDO DEL REY PINEDA

2do. SUPLENTE: M. GUILLERMO DEL REY PINEDA

La parte experimental de esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Dr. Diego Julio Arenas Aranda
Director Externo de Tesis

M. Juan Antonio Giménez Scherer
Director Interno de Tesis

Miryam González González
Sustentante

*A*gradezco a Dios por darme el regalo más valioso para todo ser humano: la vida y por la oportunidad de compartir este pequeño logro con las personas más maravillosas del mundo: mi familia, ya que sin ellos, sin su amor y su apoyo, nada de esto habría sido posible.

Mamá, papá, ustedes son un verdadero ejemplo de esfuerzo y dedicación. Gracias por todo, por estar siempre junto a mí aún en los momentos difíciles, los amo y les dedico este trabajo con todo mi corazón.

Magos, más que mi tía y mi hermana mayor, has sido y siempre serás mi mejor amiga, gracias por cuidarme y acompañarme todos estos años. Sé que muy pronto, esa personita tan especial que tienes a tu lado te dará una satisfacción aún más grande que ésta.

Sammy, eres la pequeña que ha alegrado mi vida, gracias por existir.

I dedicate this to you Angel, thanks for everything, for being my strength to carry on, for giving me hope with your endless love and for showing me the meaning of a real wonderful friendship...true friends will never part, maybe in distance but not in heart.

A toda mi familia, gracias por su cariño y apoyo, en especial a mi tío Jorge González, quien sin importar el momento, siempre estuvo dispuesto a resolver mis dudas en algunas materias, sin ti la física me habría vencido. Omar, agradezco toda tu ayuda para la impresión de esta tesis.

Caro, mil gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad de formar parte de la Unidad de Investigación y por compartir algunos de tus conocimientos conmigo. Me siento afortunada de haber sido tu alumna.

Al Dr. Diego Arenas, gracias por darme éste proyecto, por sus enseñanzas, disposición y consejos. A todos y cada uno de mis profesores que ayudaron en mi formación profesional; Dr. Juan Antonio Jiménez, gracias por su confianza y asesoría.

A todos mis amigos y compañeros de la Universidad, del laboratorio y de mi trabajo, en especial a tí Michelle, Andrés, Jesús Enrique, Mario, Rigo, Edgar, Edith, Antonio, Felipe; quisiera nombrarlos a cada uno de ustedes, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, por toda su ayuda y sus consejos. Jesús Díaz, ojalá nuestra amistad siga por muchos años más, no sabes como me hubiera gustado que fueras mi compañero en la licenciatura y te graduaras conmigo. Adriana Boiso, gracias por la información proporcionada para este trabajo.

And last but not least, I'd like to dedicate this achievement to my dear wonderful children Sammy, Vanne, Gerardo, Ari, Ruben, Bianca, Edgar and the rest of you... thank you all for helping me to discover that the joy of life lies within ourselves and that it is so much stronger than any fear, pain or distress. You're my inspiration and my true teachers! I love you dearly.

INDICE

Resumen

Abstract

Introducción

Genética del cáncer

- 1.1 Generalidades
- 1.2 Oncogenes
 - 1.2.1 Activación del protooncogén
 - 1.2.2 Factores de crecimiento
 - 1.2.3 Receptores de los factores de crecimiento
- 1.3 Genes supresores de tumor

Cáncer de mama

- 2.1 Cáncer de mama familiar
- 2.2 Factores de riesgo de cáncer de mama
 - 2.2.1 Factores genéticos y familiares
 - 2.2.2 Factores hormonales
 - 2.2.3 factores ambientales
- 2.3 Tumores malignos de la mama
 - 2.3.1 Carcinoma *in situ*
 - 2.3.2 Tumor filoides
 - 2.3.3 Angiogénesis y metástasis
- 2.4 Evaluación clínica y clasificación en estadios

Apoptosis

- 3.1 Historia y terminología
- 3.2 Características morfológicas y bioquímicas
- 3.3 Caspasas y apoptosis
 - 3.3.1 Mecanismo de activación de caspasas
 - 3.3.2 Sustratos celulares de las caspasas
 - 3.3.3 Inhibidores de las caspasas
- 3.4 Genes involucrados en la apoptosis
 - 3.4.1 *bcl-2*
 - 3.4.2 Otros genes

Mcl-1

- 4.1 Características generales
- 4.2 Estructura
 - 4.2.1 Mcl-1L, Mcl-1S
- 4.3 Síntesis y degradación
- 4.4 Funciones biológicas
- 4.5 Localización intracelular y asociación membranal de Mcl-1

Planteamiento del problema

Justificación

Hipótesis

Objetivos

Material y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Bibliografía

Glosario

Anexo I

Anexo II

RESUMEN

En todos los tejidos normales, existe un balance entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. La desregulación de estos eventos moleculares contribuye a una gran variedad de enfermedades en el humano, incluyendo el cáncer.

La apoptosis es un evento de muerte celular programada genéticamente determinado, esencial para la homeostasis tisular y para la remoción de células dañadas que puede ser disparado por una gran variedad de estímulos que causan la liberación del citocromo *c* de la mitocondria y la activación de las caspasas. Las caspasas pueden hidrolizar sustratos específicos en las proteínas e intervenir en la muerte celular. La liberación del citocromo *c* es un punto importante de control en el que las proteínas relacionadas a Bcl-2 juegan un papel importante. Algunos miembros de esta familia son necesarios en la apoptosis, mientras que otros la contrarrestan.

Mcl-1 es un miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2 descubierto durante la diferenciación celular de la leucemia mieloide que también puede ser hidrolizado por las caspasas.

El gen humano *mcl-1* se localiza en el cromosoma 1q21 y comprende tres exones codificantes de los que deriva Mcl-1L, una proteína de 350 aminoácidos que contiene regiones similares a otras proteínas de la familia Bcl-2, tales como los dominios BH, PEST y TM y cuya expresión da como resultado la supervivencia celular.

Sin embargo, *mcl-1* sufre empalme alternativo, originando una proteína de 271 aminoácidos denominada Mcl-1S/ Δ TM. En esta variante, existe un cambio en el marco de lectura, y carece de los dominios BH1, BH2 y TM debido a la pérdida del exón central, lo que hace de Mcl-1S/ Δ TM un producto génico que únicamente contiene el dominio BH3 y que promueve la muerte celular.

En este estudio, se analizó la expresión de las isoformas *L* y *S* del gen *mcl-1* en 10 carcinomas mamarios y 2 tumores filoides a nivel de RNA, mediante reacciones de PCR y electroforesis. Se obtuvieron dos productos diferentes, uno de los cuales, corresponde al tamaño esperado para la isoforma Mcl-1L, además de estar presente en todas las muestras. El otro producto, Mcl-1S estuvo presente en solo 4 de las 12 muestras junto con la variante anterior, aunque debido a una tinción menos intensa, se considera como un transcrito de menor abundancia.

La actividad de Mcl-1S fue antagonizada o completamente bloqueada por Mcl-1L en el resto de las muestras, en donde la variante proapoptótica no está presente.

Así mismo, es importante considerar la posibilidad de que las isoformas de esta proteína puedan formar heterodímeros al unirse una con otra o con otros miembros de la familia Bcl-2, esto podría influir en la concentración relativa de ambas isoformas y determinar si la célula sobrevive o se somete a apoptosis.

ABSTRACT

A balance between cell proliferation, cell differentiation and cell death exists in all normal tissues. The deregulation of these molecular events contributes to a variety of human diseases, including cancer.

Apoptosis is a genetically determined cell death program essential for tissue homeostasis and removal of damaged cells, that can be triggered by a wide range of stimuli, involving the cytochrome *c* release from the mitochondria and the activation of caspases. Caspases can cleavage specific protein substrates and lead to cell death. The release of cytochrome *c* is a crucial control point in which Bcl-2 related proteins play an important role. Some members of this family are required for apoptosis, while others counteract it.

Mcl-1 (myeloid cell leukaemia-1), is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family discovered during myeloblastic leukemia cell differentiation and it can also be cleaved by caspases.

The human *mcl-1* gene is located on chromosome 1q21 and comprises three coding exons from which derives Mcl-1L, a 350 amino acid residue protein that contains similar regions to other Bcl-2 family proteins, such as the BH, PEST and TM domains and whose expression results in enhanced cell survival.

Nevertheless, *mcl-1* undergoes alternate splicing, giving rise to a 271 amino acid residue protein isoform termed Mcl-1S/ Δ TM. In this variant, there is a shift in the reading frame, and because of the skipping of the central exon, the BH1, BH2 and TM domains are not present, turning Mcl-1S/ Δ TM into a BH3 only gene product that promotes cell death.

In this study, the expression of the *mcl-1* gene isoforms *L* and *S* was examined in 10 breast carcinomas and 2 phyllodes tumors at the RNA level, using PCR reactions and electrophoresis. Two different products were obtained, one of which corresponds to the expected size for the Mcl-1L isoform and it was detected in all samples. The other product, Mcl-1S, was found in only 4 of the 12 samples along with the full-length variant although due to a less intense stained product, it was considered as a transcript of lower abundance.

The action of Mcl-1S was antagonized or completely blocked by Mcl-1L in the remaining samples in which this pro-apoptotic variant was not present.

Yet, it is important to consider the possibility that the protein isoforms can form heterodimers when bound to each other or with another members of the Bcl-2 family, this could influence the relative concentration of both isoforms and determine whether the cell survives or undergoes apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Genética del cáncer

1.1 Generalidades

El término cáncer agrupa a un conjunto de enfermedades que reúnen como característica común la pérdida del control de la proliferación celular. Este conjunto de enfermedades, con patologías diferenciales características, se produce como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas en una misma estirpe celular, proceso que puede prolongarse hasta más de dos décadas y que requiere una selección de la línea celular apropiada para cada tejido. Entre los múltiples pasos necesarios para la generación de la estirpe celular maligna, se deben acumular alteraciones en genes de diversa naturaleza y función, conjuntamente con el escape del control del sistema inmune del organismo. Las alteraciones se producen en genes críticos para la regulación de la división celular, la diferenciación o la conexión del programa de muerte celular programada o apoptosis.¹ Como resultado de estas alteraciones génicas, se produce la pérdida de capacidad de regulación del comportamiento celular, con el resultado neto de un crecimiento descontrolado.

Los avances registrados en el estudio de los mecanismos moleculares del cáncer han supuesto un gran impulso en la comprensión del proceso de carcinogénesis, la identificación de los diferentes componentes que constituyen los eslabones del mismo y la interrelación de sus respectivas actividades. Estos estudios han permitido definir al proceso de regulación del ciclo celular y los mecanismos de transmisión de señales intracelulares en el desarrollo del proceso de la carcinogénesis. Aunque este conocimiento todavía no es completo, ha permitido al menos establecer las claves moleculares del proceso de transformación celular y el poder elaborar estrategias más selectivas de eliminación de las células tumorales.

Los descubrimientos en el campo de los genes relacionados con el cáncer (oncogenes, genes supresores y genes reparadores) ha influido no solo en la investigación oncológica, sino en otros muchos aspectos del comportamiento celular tanto en condiciones normales como patológicas.

Las estadísticas muestran que el cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país después de las enfermedades cardiovasculares, afecta a los humanos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. Se clasifica de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se origina. La proliferación celular genera una masa (neoplasia o tumor) que invade los tejidos vecinos y puede producir también metástasis en lugares más distantes. El 90% de los tumores malignos en humanos son de origen epitelial ya que en los epitelios hay mayor proliferación celular y por ende muchas más posibilidades de fallas y errores en el control de la división celular.

El diagnóstico y tratamiento tempranos son vitales, así como la identificación de personas con riesgo incrementado de cáncer antes del desarrollo de la enfermedad constituye un objetivo importante de la investigación.

Un tumor está compuesto de un parénquima de células proliferativas, con un estroma de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Existen tres formas principales: sarcomas, en los que el tumor se ha formado en el tejido mesenquimatoso; carcinomas, que se originan en el tejido epitelial y enfermedades malignas hematopoyéticas y linfoides, como la leucemia y los linfomas.¹ Dentro de los grupos principales, los tumores se clasifican por su lugar, tipo de tejido y grado de malignidad. La mayor parte de los cánceres son trastornos de la época tardía de la vida, pero algunos son característicos de la infancia o pueden mostrar un grado mayor de malignidad si se presentan en personas jóvenes.

Quizás el 5% de todos los cánceres parecen seguir un patrón familiar; en la mayor parte, sin embargo, la herencia parece desempeñar un papel pequeño o nulo. No obstante, muchos cánceres, como otras enfermedades que muestran características de herencia multifactorial, poseen un importante componente genético en cuanto a que ciertas personas son más susceptibles de desarrollar una malignidad particular como resultado de defectos genéticos que predisponen al cáncer. Además, es evidente que prácticamente todo cáncer es esencialmente—incluso en ausencia de componentes heredados aparentes— el resultado de mutaciones en células somáticas y su progresión también implica cambios en la expresión de una serie de genes.

Con anterioridad, los virus y la exposición a ciertos agentes ambientales se señalaron como causas de la mayor parte de los cánceres. Hoy, se reconoce que la causa es la mutación génica y, cuando participan agentes carcinógenos, operan produciendo mutación. Las mutaciones que provocan cáncer afectan los genes responsables de la proliferación celular, el desarrollo de la célula y otras actividades celulares fundamentales. Cuando la regulación celular normal está alterada, se inicia el crecimiento descontrolado y se desarrolla un tumor maligno.

La comprensión de la base genética del cáncer que surge después de muchas décadas de investigación se ha producido en gran medida por la aplicación de la genética molecular al análisis de varias formas de enfermedad maligna.¹ El campo de la genética del cáncer es uno de los de mayor movimiento en la biología y medicina actuales y la comprensión de los mecanismos del cáncer se está incrementando con rapidez.

Existen pruebas firmes de que un tumor es un clon de células derivadas de una sola célula ancestral en la que ha ocurrido el evento iniciador: una mutación somática. La naturaleza clónica de los tumores se conoce desde hace muchos años. La prueba original se obtuvo del estudio de tumores en mujeres heterocigotas para la enzima ligada al X G6PD (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa). Debido a la

inactivación del X, sólo uno del par de alelos ligados al X en una mujer heterocigota se expresa en una célula somática.¹

Las líneas celulares derivadas de tumores en estas mujeres expresaron uno u otro alelo de G6PD pero no ambos, lo que indicó que cada tumor había crecido de una sola célula. Los reordenamientos cromosómicos característicos en muchos tipos de cáncer indican que tienen origen en una sola célula.

Los genes que provocan cáncer, cuando están mutados, son de dos tipos distintos: oncogenes y genes supresores de tumor.¹ Ambos tipos tienen efectos opuestos en la carcinogénesis. Los oncogenes facilitan la transformación maligna, mientras que los genes supresores de tumores como su nombre lo indica, bloquean el desarrollo tumoral, regulando los genes que participan en el crecimiento celular.

1.2 Oncogenes

Los oncogenes son genes que afectan el crecimiento y desarrollo celular normal. Si un oncogén está sobre expresado, a causa de una mutación en el gen mismo o por una alteración externa, la célula en la que ocurre el cambio puede sufrir crecimiento descontrolado y finalmente convertirse en maligna. La mayor parte de los oncogenes son formas mutadas o activadas de genes normales, denominadas protooncogenes, que participan en el control de la proliferación y diferenciación celular.

Los oncogenes pueden identificarse experimentalmente en estudios de transferencia de DNA por su capacidad para transformar una línea celular de ratón no oncogénica en cultivo para que genere células con propiedades oncogénicas.

Hasta la fecha se ha identificado una gran cantidad de oncogenes humanos y por tanto sus protooncogenes normales, sobre todo gracias a los estudios de transfección de DNA con DNA genómico de tumores humanos. Muchos de los oncogenes identificados en tumores humanos han llegado a relacionarse con oncogenes víricos previamente aislados de virus tumorales de RNA.

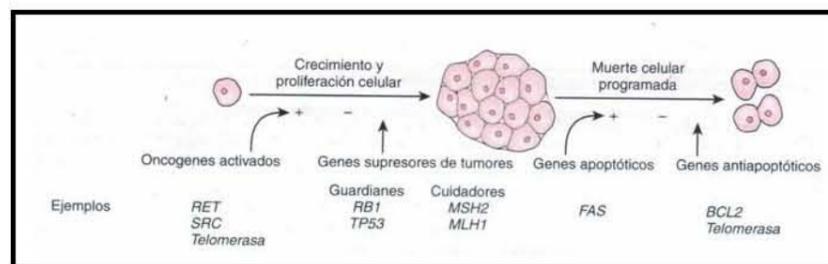


Fig. No. 1. Esquema general de los mecanismos de oncogénesis por activación de protooncogenes, mutación o pérdida de genes supresores de tumores, activación de genes antiapoptóticos o pérdida de genes proapoptóticos.

La demostración de que la información genética de un virus podía cambiar una célula normal en maligna estableció la posibilidad de que los genes actuaran como controladores centrales de la conversión maligna. (Fig. No. 1)

En el siguiente esquema (Fig. No. 2) se ilustran los diferentes papeles de varias clases de protooncogenes en la regulación del crecimiento.

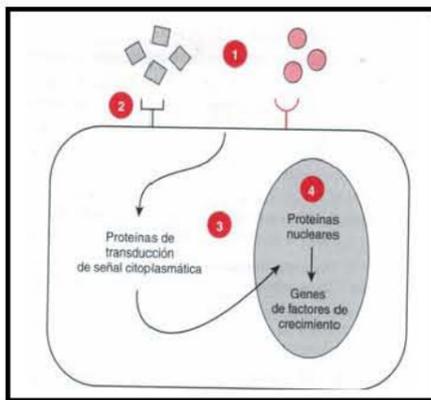


Fig. No. 2 Transducción de señales y regulación del crecimiento por los productos de protooncogenes, clasificados según su localización y función en la célula. Si se produce una falta de regulación de un protooncogén puede originarse una transformación maligna. 1: Factores de crecimiento secretados (EGF y PDGF), 2: receptores específicos de los factores de crecimiento secretados (RET), 3: proteínas de transducción de señal citoplasmática (RAS), 4: proteínas nucleares que se enlazan al DNA y modifican la transcripción.

Tabla No. 1.-Oncogenes vinculados en el control de la división celular.

Oncogén	Actividad bioquímica	Probable función
<i>erb-B</i>	Tirosina cinasa	Receptor en la superficie celular
<i>fms</i>	Tirosina cinasa	Receptor en la superficie celular
<i>neu</i>	Tirosina cinasa	Receptor en la superficie celular (aún no identificado)
<i>ros</i>	Tirosina cinasa	Receptor en la superficie celular (aún no identificado)
<i>sis</i>	Factor de crecimiento FCP	Señalización
<i>src</i>	Tirosina cinasa	Transducción de señales
<i>abl</i>	Tirosina cinasa	Transducción de señales
<i>ras</i>	Proteína G	Transducción de señales
<i>fos</i>	Factor de transcripción	Efector de la división celular
<i>myc</i>	Factor de transcripción	Efector de la división celular
<i>myb</i>	Factor de transcripción	Efector de la división celular

Así mismo, es notable el hecho de que numerosos oncogenes ya han sido vinculados con el control de la proliferación celular (Tabla No. 1). Los productos de tres de los oncogenes enlistados en la tabla, se localizan en el núcleo de la célula y parecen participar en la activación de genes que provocan la división celular. En tanto que los productos de los oncogenes restantes, se encuentran en la membrana o cerca de ella, como *erb* que es una versión alterada del receptor del factor de crecimiento epidérmico al que le falta el dominio externo, por lo que se encuentra permanentemente activo. Por otra parte, *sis*, controla la síntesis de la cadena B del factor de crecimiento plaquetario y los restantes están relacionados con enzimas fosforilantes (proteínas cinasas).

Un importante hallazgo relacionado con los protooncogenes surgió del análisis molecular del oncogén *ras* derivado de una línea celular. El oncogén y su contraparte, el protooncogén diferían tan solo en un par de bases. La alteración, una mutación puntual en una célula somática del tumor, propició la síntesis de un producto génico anormal que pudo estimular el crecimiento de la línea celular y convertirla en un tumor. Los oncogenes tienen un efecto dominante a nivel celular, es decir, cuando se activa en un solo alelo mutante es suficiente para cambiar el fenotipo de una célula de normal a maligna. Las mutaciones puntuales en *ras* se observan en muchos tumores y experimentalmente se ha mostrado que los genes *ras* constituyen la diana de carcinógenos conocidos, un hallazgo que apoya el papel de los genes *ras* mutados en el desarrollo de muchos cánceres.¹

1.2.1 Activación del protooncogén

La mutación estructural es sólo uno de los varios mecanismos que pueden inducir activación de protooncogenes. Las translocaciones cromosómicas son un mecanismo frecuente para la activación de un protooncogén en diversos cánceres. Muchas células tumorales muestran anomalías cromosómicas y un tipo de cambio cromosómico observado en las células cancerosas es la translocación que se caracteriza por el desprendimiento de una fracción de un cromosoma que se une a otro cromosoma. Si a su vez el segundo cromosoma cede material al primero se dice que la translocación es "recíproca". Se han encontrado translocaciones características en diversas células tumorales.

Los cambios citogenéticos son típicos del cáncer y mucho más frecuentes en estadios tardíos o invasivos que en estadios tempranos del desarrollo tumoral. Hasta ahora la mayor parte de los estudios citogenéticos basados en la progresión tumoral se han relacionado con las leucemias. Otro mecanismo importante para la sobreexpresión es la amplificación génica, un proceso raro o inexistente en las células normales, pero que algunas veces resulta frecuente en las células cancerosas. Los segmentos amplificados de DNA a menudo se detectan como dos tipos de cambio citogenético, diminutos dobles (cromosomas accesorios muy pequeños) y regiones homogéneamente teñidas (HSR), que no se bandean de forma normal y contienen múltiples copias amplificadas de un segmento particular

de DNA. Aún no se entiende cómo y porqué se producen los diminutos dobles y las HSR, pero se sabe que las regiones amplificadas incluyen copias adicionales de protooncogenes con efectos en el crecimiento celular. Un aspecto importante del inicio y progresión de la carcinogénesis por protooncogenes activados es que la mutación de un solo gen parece incapaz de provocar la transformación; más bien, parece que se requieren de genes separados con efectos complementarios. La transformación maligna constituye un proceso de eventos múltiples que no se logra con un solo paso.

Cuando se considera el papel de los oncogenes en el cáncer, es importante tomar en cuenta que la activación de oncogenes no es la única vía de malignidad. Es probable que su activación, por lo menos en algunos casos, sea sólo un efecto secundario relacionado con la transformación, más que un fenómeno causal.

1.2.1 Factores de crecimiento

Existen varios factores de crecimiento polipeptídicos que estimulan la proliferación de las células normales y se sospecha que muchos de ellos intervienen en el origen del tumor. Las mutaciones de los genes que codifican los factores de crecimiento pueden convertirlos en oncogénicos. Así sucede con el protooncogén *c-sis*, que codifica la cadena β del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FDGF). Este oncogén se descubrió primero como oncogén viral contenido en *v-sis*. Posteriormente se comprobó que varios tumores humanos, producen PDGF. Además, parece que el mismo tumor expresa también receptores para el propio PDGF, sometiéndose a una estimulación autocrina. Aunque se considera que es un elemento importante en la patogenia de varias neoplasias, en la mayoría de los casos el gen del factor de crecimiento no está alterado ni mutado. Por el contrario, lo más frecuente es que los productos de otros oncogenes, por ejemplo *ras* (situado a lo largo de la vía de transducción de señales), induzcan una expresión excesiva de los genes de los factores de crecimiento, forzando a las células a secretar grandes cantidades de factores de crecimiento, tales como el factor transformador de crecimiento α (TGF- α), que está relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y que induce la proliferación uniéndose a su receptor. En los carcinomas que expresan niveles elevados de receptores del EGF suele detectarse TGF- α .

Además de *c-sis* en varios tumores mamarios por ejemplo, hay activación de un grupo de oncogenes relacionados entre sí (*hst-1* y *hst-2*) que codifican proteínas homólogas a los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF); los melanomas humanos expresan bFGF, un miembro de la familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos que sin embargo, no es expresado por los melanocitos normales. Los carcinomas de células pequeñas del pulmón producen péptidos similares a aquellos que estimulan su proliferación.²

1.2.3 Receptores de los factores de crecimiento

En el siguiente grupo en la cadena de la transducción de la señal intervienen los receptores de los factores de crecimiento. Para comprender la forma en que la mutación afecta a la función de los mismos, debe recordarse que varios receptores de los factores de crecimiento son proteínas transmembranales con un ligando de unión situado fuera de la célula y un dominio intra citoplasmático formado por tirosina-cinasa. En las formas normales de estos receptores, la actividad cinasa sufre una activación transitoria cuando el receptor capta a su factor de crecimiento específico, a lo que sigue rápidamente la dimerización del receptor y la fosforilación por la tirosina de varios sustratos que forman parte de la cascada de la mitosis u otras vías. Las versiones oncogénicas de estos receptores sufren dimerización y activación persistentes sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente. De esta forma, el receptor mutante libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis.

En los tumores humanos, la activación de los factores de crecimiento se produce a través de varios mecanismos, entre los que se encuentran mutaciones, reordenamientos de los genes o su expresión excesiva.

Mucho más frecuente que las mutaciones de estos protooncogenes es la expresión excesiva de formas normales de receptores de factores de crecimiento. Los que se afectan con mayor frecuencia son tres miembros de la familia de receptores del EGF.² En algunos casos, el aumento de la expresión del receptor provoca la amplificación del gen. En la mayoría de los casos restantes, se desconoce la base molecular que justifica el aumento de la expresión del receptor. Por el contrario, el gen *c-erb B2* (también llamado *c-neu*), el segundo miembro de la familia de receptores del EGF se halla amplificado en un alto porcentaje de adenocarcinomas humanos de la mama, de ovario, de pulmón o de estómago. En los cánceres de mama también se observa sobreexpresión de un tercer miembro de la familia de receptores del EGF, *c-erb B3*. Podría sospecharse que los tumores que muestran una expresión excesiva de los receptores de factores de crecimiento, por ejemplo de *c-erb B2*, deberían ser muy sensibles a los efectos estimulantes del crecimiento de una pequeña cantidad de los factores implicados, lo que los haría más agresivos. La observación de que la existencia de concentraciones elevadas de proteína *c-erb B2* en las células del cáncer de mama es una señal de mal pronóstico respalda esta hipótesis.

1.3 Genes supresores de tumor

Mientras los productos de protooncogenes promueven el crecimiento, los productos de los genes supresores de tumor normalmente bloquean el crecimiento anormal y la transformación maligna y contribuyen al proceso maligno solo cuando se pierden la función de ambos alelos. Es decir, en contraste con las mutaciones en

protooncogenes que son dominantes en su acción, las mutaciones en los genes supresores de tumores son recesivas.

La formación de un tumor, no sólo requiere la activación de un protooncogén o la pérdida de función de ambos alelos de un gen supresor de tumor, el desarrollo de enfermedad maligna, constituye un proceso de múltiples etapas que incluye una sucesión de cambios genéticos en la población celular del tumor en desarrollo.

Uno de los hallazgos con respecto a la progresión tumoral es que la pérdida o inactivación del mismo gen puede contribuir al desarrollo de varios cánceres. Por ejemplo, el gen *p53*, que se localiza en el cromosoma 17p13 falta o es anormal en células de cánceres esporádicos de pulmón o mama. Aunque aún no es clara la sucesión completa de cambios genéticos secundarios y su papel en la progresión tumoral, es obvio que se requieren varias mutaciones en diferentes loci para que un tumor alcance su potencial completo de malignidad. Debido a que los genes supresores de tumor y sus productos son por naturaleza protectores frente al cáncer, se espera que su comprensión finalmente lleve a mejorar los métodos de terapia anticancerosa.

Cáncer de mama

2.1 Cáncer de mama familiar

Durante mucho tiempo se ha reconocido que el cáncer de mama posee un fuerte componente genético.³ El riesgo de una mujer de sufrir este tipo de cáncer se incrementa hasta tres veces si un familiar en primer grado está afectado y hasta 10 veces si más de un familiar de primer grado presenta la enfermedad. Estos riesgos familiares aumentan incluso si el inicio de la alteración en la paciente es a los 40 años de edad o antes. Aunque un 20% de todos los casos de cáncer de mama pueden tener un componente genético significativo como parte de un modo de herencia poligénico o multifactorial, una pequeña proporción de casos parecen deberse a predisposición mendeliana heredada con carácter dominante. Estas familias comparten características típicas de cáncer familiar (en comparación con el esporádico): múltiples mujeres afectadas, edad de inicio más precoz, enfermedad bilateral frecuente e incidencia incrementada en cáncer de mama en varones.

Los estudios poblacionales han indicado que del 2 al 5% de los casos de cáncer de mama se deben a herencia de un gen de susceptibilidad principal. Los estudios de ligamiento genético en familias con cáncer de mama de inicio precoz han localizado un gen dominante para la susceptibilidad incrementada a esta enfermedad en el brazo largo del cromosoma 17. Este alelo de susceptibilidad presenta una frecuencia estimada de 0.003. De este modo, puede calcularse que la frecuencia de portadores femeninos es de alrededor del 1%. Estos estudios indican también que la susceptibilidad del cáncer de mama es genéticamente heterogénea:

uno o más genes deben participar en el cáncer de mama familiar de inicio tardío, ya que estas familias no muestran ligamiento con el locus en el cromosoma 17q. La detección presintomática de mujeres con riesgo de desarrollar cáncer de mama como resultado de cualquiera de estos genes de susceptibilidad constituye un objetivo importante de las investigaciones actuales, tanto en casos familiares como en el gran número de casos esporádicos.

2.2 Factores de riesgo de cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en las mujeres norteamericanas y la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer.⁴ Durante las últimas décadas se ha registrado un aumento bastante estable e importante de la incidencia de la enfermedad. Los datos recopilados entre 1988 y 1990 indican que el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es del 12.2% o de una por cada ocho mujeres.⁵ La historia natural del cáncer de mama se caracteriza por la larga duración y la heterogeneidad entre las pacientes. En la actualidad se puede esperar que alrededor de la mitad de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama viva el resto de sus vidas sin recurrencia, y una tercera parte morirá a causa de la enfermedad. El riesgo de muerte por cáncer de mama a lo largo de la vida es de 3.6% o de una por cada 282. La relativa constancia de la mortalidad, a pesar del aumento de la incidencia puede deberse a los mejores resultados secundarios en la detección precoz y a los avances en el tratamiento, además del aumento de una forma más benigna de la enfermedad.⁶

Se han identificado numerosos factores de riesgo que se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama. Estos pueden agruparse en factores genéticos y familiares, factores hormonales, factores dietéticos, enfermedad benigna de la mama y factores ambientales. Sin embargo a pesar del reconocimiento de estos factores de riesgo, alrededor del 50 % de las mujeres que desarrollan cáncer de mama no tienen factores de riesgo identificable, aparte del hecho de ser mujeres y de envejecer.⁷

2.2.1 Factores genéticos y familiares

Estudios llevados a cabo por Broca en el siglo XIX⁸ establecieron que el cáncer de mama puede seguir un patrón de aparición familiar en el 5 al 10% de los casos. Además, se ha observado que familias con una incidencia muy alta en la enfermedad presentan a veces una incidencia elevada de otros tipos de cáncer, como el de ovario. Se propuso la hipótesis de que esas familias heredaran un alelo codificante de un gen supresor tumoral defectuoso o ausente.

El primer gen supresor tumoral con herencia demostrada en el cáncer de mama se denominó *p53*. El estudio del gen *p53* ha proporcionado importantes conocimientos en muchas áreas de la biología del cáncer. Cuando *p53* experimenta alguna mutación, aumenta su estabilidad y sus propiedades reguladoras sufren alguna alteración radical. La mutación puede conceder la

pérdida de la actividad supresora tumoral o bien la ganancia de función promotora tumoral, o ambas.

El producto génico no mutado es una proteína de fijación del DNA oligomérica que actúa desencadenando respuestas celulares ante la lesión del DNA y a la cual se le ha denominado "guardián del genoma".

Desde hace tiempo se ha reconocido a la historia familiar de cáncer de mama como un factor de riesgo de la enfermedad. La identificación del gen *brca-1*⁹ que cuando experimenta una mutación se asocia a un riesgo elevadísimo de desarrollo de cáncer de mama, ha ofrecido nuevas perspectivas del riesgo de padecer cáncer de mama. En la actualidad parece que existen dos tipos de riesgo de cáncer de mama asociados a una historia familiar de dicho cáncer. El cáncer de mama hereditario, debido a la herencia de una mutación en una línea germinal específica de un gen supresor tumoral procedente de familiares maternos o paternos, es poco frecuente, estimándose que corresponde del 5 al 10 % de los casos de cáncer de mama de transmisión genética en mujeres con varios familiares con cáncer de mama (generalmente más de tres), especialmente de ovario. El riesgo de cáncer de mama de transmisión genética varía con la edad de comienzo de la enfermedad, considerándose que un 33% de las mujeres diagnosticadas antes de los 30 años son portadoras de un gen anormal, en comparación con el 13% de las diagnosticadas entre los 40 y los 49 años y sólo el 1% de las mujeres de 80 años o más.¹⁰ En la mayor parte de las mujeres con una historia familiar de cáncer de mama, la enfermedad no está ligada a una mutación de la línea germinal en un gen supresor tumoral, y el nivel de riesgo es mucho menor. El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta en 1.5 a 3 veces cuando la madre o una hermana tiene la enfermedad. En la mayor parte de las mujeres con una historia familiar, el riesgo de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida no supera el 30%.

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama parece que se transmiten de manera autosómica dominante. En la actualidad se ha comprobado que mutaciones del *brca-1*, *brca-2* y del gen supresor tumoral *p53* son portadores de un riesgo muy aumentado de cáncer de mama, es probable que en el futuro se identifiquen otros genes de susceptibilidad al cáncer. Las mutaciones de la línea germinal del gen *brca-1*, localizado en el cromosoma 17q21, se asocian a un riesgo de cáncer de mama del 50% a los 45 años y del 85% durante toda la vida.¹¹ Además, el riesgo de un segundo cáncer de mama primario es del 65% para las portadoras del gen *brca-1* mutado que viven a los 70 años. En las familias de alto riesgo se han caracterizado más de 80 mutaciones diferentes del *brca-1*.¹²

El *brca-1* es un gen grande y todavía no es seguro que todas las mutaciones supongan el mismo riesgo. La consecuencia de las mutaciones que se producen en ausencia de una historia familiar firme de la enfermedad es también dudosa. Sin embargo, un informe reciente indica que el producto genético *brca-1*

tiene una localización subcelular aberrante en muchos cánceres de mama que no son portadores de mutaciones de la línea germinal del *brca-1*¹³ lo que indica que el papel que desempeña este gen en la patogenia del cáncer de mama es mayor de lo esperado inicialmente.

Se ha identificado un segundo gen *brca-2* en el cromosoma 13 que se asocia a una aparición precoz del cáncer de mama. El nivel de riesgo del cáncer de mama con mutaciones del *brca-2* es similar al observado con el *brca-1*. Las mutaciones del *brca-2* conceden también un mayor riesgo de cáncer de mama masculino. El cáncer de mama se observa también formando parte de otros síndromes familiares, en los que a su vez, participan diferentes genes (Tabla No. 2), como en el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden, el síndrome de Muir y la ataxia telangiectasia.¹⁴

Tabla No. 2. Defectos genéticos en el cáncer de mama

<i>Genes del cáncer de mama familiar establecidos</i>		
Gen	Enfermedad	
P53	Síndrome de Li-Fraumeni de varios cánceres hereditarios	
brca-1	Cánceres familiares de mama y ovario en la mujer	
brca-2	Cánceres de mama familiares en mujeres y varones	

<i>Genes de progresión del cáncer de mama establecidos</i>		
Gen	Clase	Función
myc	Oncogén	Regulador del ciclo/muerte celular
p53	Gen supresor	Regulador del ciclo/muerte celular/ reparación del DNA

2.2.2 Factores hormonales

El cáncer de mama tiene una relación clara con hormonas, y numerosos estudios han relacionado la incidencia de cáncer de mama con la edad de la menarquía, de la menopausia y del primer embarazo. La incidencia del cáncer de mama específica por edad aumenta a gran velocidad con la edad hasta el momento de la menopausia, y después la velocidad de aumento se hace más lenta, hasta llegar a una sexta parte de la observada en el período premenopáusico.

La exposición intrauterina a concentraciones elevadas de estrógenos puede aumentar el riesgo de cáncer de mama.¹⁵ La edad en el momento de la menarquía y el establecimiento de ciclos ovulatorios regulares parece que presenta una asociación fuerte con el riesgo de cáncer de mama.¹⁶ La edad en el momento de la menopausia es otro factor de riesgo; el riesgo relativo a desarrollar cáncer de mama en una mujer con menopausia natural antes de los 45 años es la mitad que el de las mujeres en las que la menopausia se produce después de los 55 años.¹⁷ A partir de estos datos, parece probable que la duración total de la vida menstrual sea un factor importante en el riesgo de cáncer de mama.

La paridad y la edad del primer embarazo son otros factores que influyen en el riesgo de éste cáncer, las mujeres nulíparas tienen un mayor riesgo a desarrollar cáncer de mama que aquellas que hayan tenido hijos, con un riesgo relativo aproximado de 1,4.¹⁸ El efecto del embarazo a término varía con la edad del primer embarazo, presentando las mujeres cuyo primer embarazo a término tuvo lugar después de los 30 años un aumento de 2 a 5 veces en el riesgo de cáncer de mama.

El tejido mamario puede experimentar diferenciación debido a los cambios hormonales durante el embarazo, y parece que estas células diferenciadas tienen menos probabilidades de experimentar transformación maligna, aunque por otro lado, la persistencia de los cambios en los niveles hormonales después de un embarazo puede alterar la velocidad proliferativa del tejido mamario.

El efecto de las hormonas exógenas, en forma de tratamiento de sustitución hormonal a base de estrógenos, ha sido ampliamente estudiado, mostrando aumentos pequeños en el riesgo, pero estadísticamente significativos para las consumidoras.¹⁹ En estos estudios, parece que el riesgo aumenta con la duración del consumo de estrógenos.

2.2.3 Factores ambientales

La exposición a radiación ionizante, como aquella que resulta de métodos diagnósticos y terapéuticos aumenta el riesgo de cáncer de mama. La exposición a radiación después de los 40 años produce un aumento mínimo del riesgo, mientras que la exposición a edades tempranas lleva consigo el mayor riesgo. Otros factores ambientales, tales como la exposición a campos electromagnéticos o a pesticidas organoclorados, pueden elevar el riesgo de cáncer de mama, pero son necesarios nuevos datos antes de considerarlos concluyentes.²⁰

2.3 Tumores malignos de la mama

2.3.1 Carcinoma *in situ*

- Carcinoma ductal *in situ*

El carcinoma ductal *in situ*; también llamado carcinoma intraductal o no infiltrante, es una proliferación de células epiteliales malignas limitadas a los conductos y lobulillos mamarios, sin indicios demostrables de invasión a través de la membrana basal hacia el estroma circundante.

Es una entidad clara tanto en cuanto a su presentación clínica como en cuanto a su potencial biológico a partir del carcinoma lobulillar *in situ*. Antes, el carcinoma ductal *in situ* era una lesión poco frecuente que se trataba habitualmente con mastectomía, prestándose escasa atención a la definición de su historia natural o a la investigación de tratamientos locales alternativos.

La utilización generalizada de la detección selectiva con mamografía ha conseguido un importante aumento de la tasa de detección de carcinoma ductal *in situ*,²¹ y la aceptación de tratamientos conservadores de la mama para el tratamiento del carcinoma invasivo ha planteado dudas acerca de la necesidad de realizar mastectomías de forma habitual en lesiones que solamente son precancerosas. Esta combinación de factores ha convertido al tratamiento del carcinoma ductal *in situ* en uno de los temas más debatidos en las enfermedades de la mama actualmente.

El carcinoma ductal *in situ* tiene diversas formas de presentación clínica (Fig. No. 3a). Antes, la mayor parte de los carcinomas ductales *in situ* eran macroscópicos o palpables. Sin embargo, el carcinoma ductal *in situ* se puede presentar también en forma de secreción patológica por el pezón, con presencia de masa o sin ella, como enfermedad de Paget del pezón o se puede identificar como un hallazgo accidental en la biopsia de mama realizada por otra anomalía.

Este suele aparecer en forma de microcalcificaciones agrupadas, aunque masas no palpables pueden corresponder también al carcinoma ductal *in situ*. En muchos informes de biopsias dirigidas por mamografía, los carcinomas ductales *in situ* suponen el 50% o más de los procesos malignos identificados.

El carcinoma ductal *in situ* es heterogéneo en cuanto a su histopatología, su extensión y su comportamiento biológico. Basándose principalmente en el patrón de crecimiento, el carcinoma ductal *in situ* se puede clasificar en subtipos comedo y no comedo (cribiforme, micropapilar, sólido). (Fig. No. 4a)

En comparación con los subtipos no comedo, parece que el tipo comedo tiene una mayor malignidad citológica, una mayor tasa proliferativa determinada por estudios de marcado con timidina, mayores probabilidades de asociarse a áreas de micro invasión y presenta con mayor frecuencia marcadores biológicos como aneuploidía, sobreexpresión de los oncogenes *her 2/neu* (C-erbB-2), ciclina D1 y *p53*, ausencia de expresión de *bcl-2* y angiogénesis.²² También es posible que con más experiencia, estos u otros marcadores lleguen a ser útiles para distinguir al carcinoma ductal *in situ* de las lesiones proliferativas benignas de la mama, como la hiperplasia atípica.

La presentación mamográfica de los dos tipos del carcinoma ductal *in situ* también es diferente. El subtipo comedo se asocia con mayor frecuencia a microcalcificaciones granulares gruesas, mientras que el tipo no comedo se asocia con mayor frecuencia a microcalcificaciones granulares finas.

Las estimaciones del tamaño del tipo comedo realizadas por mamografía se aproximan bastante al tamaño histológico del tumor, mientras que las estimaciones del tamaño del tipo no comedo basadas en la magnitud de las microcalcificaciones pueden ser considerablemente menores al tamaño histológico cuando se utiliza la mamografía de dos proyecciones .

La utilización de la mamografía ampliada mejora significativamente la estimación del tamaño en el caso del carcinoma ductal *in situ* tipo no comedo. Se han propuesto nuevos sistemas de clasificación que utilizan una combinación de forma, grado nuclear y necrosis,²³ pero los méritos de estos sistemas en la predicción del comportamiento biológico del carcinoma ductal *in situ* todavía tienen que demostrarse.

Un problema importante en el tratamiento del carcinoma ductal *in situ* es el riesgo de progresión a carcinoma invasivo (de un 30% a 10 años, aproximadamente), la mayor parte de estos cánceres invasivos, se localizan en el lugar donde se realizó una biopsia clasificada en un principio como benigna; o bien cerca de ella. (Fig. No. 3b)

- Carcinoma lobulillar *in situ*

El carcinoma lobulillar *in situ*, a diferencia del carcinoma ductal *in situ*, carece de signos clínicos y mamográficos. El carcinoma lobulillar *in situ*, se caracteriza microscópicamente una proliferación sólida de células pequeñas con núcleos pequeños, uniformes y redondos u ovales. (Fig. No. 3c) Las células tienen una tasa proliferativa baja, habitualmente son positivas para receptores de estrógenos y rara vez presentan sobreexpresión del oncogén *her2/neu*.^{24,25}

El carcinoma lobulillar *in situ* es multicéntrico en el 60 al 80% de los casos, y con frecuencia es bilateral.²⁶ Se desconoce la incidencia real de carcinoma lobulillar *in situ* en la población general, y la incidencia comunicada en las muestras de biopsia oscila entre el 0.5 y el 3.6%.²⁷ El carcinoma lobulillar *in situ* se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres jóvenes que en mujeres de edad avanzada, con una edad media en el momento del diagnóstico entre los 44 y los 46 años. Esta distribución de edades puede deberse a la regresión del carcinoma lobulillar *in situ* después de la menopausia o puede reflejar simplemente el hecho de que las anomalías benignas de la mama que exigen biopsia son más frecuentes en mujeres premenopáusicas.

La frecuencia con la que se diagnostica el carcinoma lobulillar *in situ* ha aumentado²⁸ debido en gran parte al mayor número de biopsias de mama asociadas a la mayor utilización de la mamografía para detección selectiva. Es posible que el mayor reconocimiento del carcinoma lobulillar *in situ* como entidad patológica haya contribuido a este aumento. Estudios previos han abordado el riesgo posterior de cáncer de mama en pacientes con un diagnóstico de carcinoma lobulillar *in situ* después de realizar sólo una biopsia.²⁹ Estos estudios demuestran que la mayor parte de los cánceres posteriores son de tipo ductal invasivo, correspondiendo los carcinomas lobulillares infiltrantes sólo a una minoría.

Una opción de tratamiento para las mujeres con carcinoma lobulillar *in situ* es una observación atenta, igual que se haría en mujeres con alto riesgo conocido

de cáncer de mama por una historia familiar o personal previa de cáncer de mama.

De hecho, el riesgo de presentar cáncer de mama del 1% al año, aproximadamente, en mujeres con carcinoma lobulillar *in situ* es muy similar al riesgo de cáncer de mama contralateral en una mujer que ha presentado enfermedad unilateral. Una opción alternativa en mujeres que no están dispuestas a aceptar el riesgo asociado a una política de observación atenta es la mastectomía simple profiláctica bilateral, habitualmente con reconstrucción inmediata. Las estrategias de tratamiento dirigidas a una mama, como la mastectomía unilateral con biopsia contralateral, carecen de lógica, puesto que el riesgo de cáncer posterior es bilateral. Cuando se elige una observación atenta no es necesaria una extirpación quirúrgica amplia con márgenes histológicamente negativos, ya que se sabe que el carcinoma lobulillar *in situ* es una lesión multifocal y no una lesión precursora. De igual forma, la radioterapia no es aplicable al tratamiento del carcinoma lobulillar *in situ*, por lo general, se recomienda que las mujeres sean sometidas a exploración de la mama a intervalos de cuatro a seis meses y que se realicen mamografías anualmente. La observación detenida se prolongará durante toda la vida de la paciente, ya que el mayor riesgo persiste de manera indefinida.³⁰

Los intentos por identificar características del carcinoma lobulillar *in situ* asociadas a una mayor probabilidad de presentar enfermedad maligna han fracasado en su mayor parte. No se han identificado factores anatomopatológicos predictivos de la aparición posterior de cáncer invasivo.³¹ (Fig No. 3d) La elección entre observación atenta y mastectomía profiláctica bilateral sólo podrán realizarla las pacientes que comprendan perfectamente los riesgos y las ventajas de las opciones de tratamiento.

2.3.2 Tumor filoides

El término tumor filoides abarca a un grupo de lesiones de potencial maligno variado, que van desde tumores completamente benignos hasta sarcomas de gran malignidad. Clínicamente, los tumores filoides son lesiones lisas, redondeadas y multilobulares que resultan imposibles de distinguir de los fibroadenomas. Se observa ulceración en la piel por tumores de gran tamaño, aunque esto suele deberse a necrosis por presión más que por invasión de la piel por células malignas.

Los tumores filoides se consideran como benignos o malignos según la naturaleza del tumor (agresivo o infiltrativo) y la presencia de actividad mitótica y de crecimiento exagerado del estroma. El porcentaje de tumores filoides malignos oscila entre el 23 y el 50%. Se encuentra metástasis axilar en menos del 5% de los casos, pero de existir se rá un signo de mal pronóstico. Lo más frecuente es que las metástasis sigan el patrón observado en los sarcomas; siendo el pulmón la localización más frecuente.

2.3.3 Angiogénesis y metástasis

El acontecimiento final que conduce a la mortalidad por cáncer de mama es la aparición de metástasis. Además de los mecanismos de proliferación disregulada, se producen otros dos procesos celulares diferentes, pero aparentemente interactivos, que permiten la aparición de metástasis de la enfermedad. Aún no se sabe si bajo estas alteraciones se encuentran alteraciones genéticas o fenotípicas. Sin embargo, se han propuesto varios determinantes moleculares para relacionar cada proceso. Durante la diferenciación parece que la pérdida de unión entre las células, la alteración de la unión del sustrato celular y de la organización citoesquelética desempeñan algún papel.

Durante la producción de la metástasis se consideran esenciales las tres influencias, pero también es necesaria la movilidad celular, proteólisis y la capacidad para sobrevivir y proliferar en zonas alejadas. Mientras que la adquisición de éste grupo de características es responsable de la invasión local del tejido del huésped por el cáncer, la capacidad de un tumor para distribuirse por zonas alejadas exige también la aparición de alguna vascularización tumoral; el complejo proceso de la angiogénesis. (Fig. No. 4b)

El proceso de la angiogénesis ha generado gran interés, dado que los vasos sanguíneos existentes deben proliferar y después invadir el área tumoral a medida que el tumor prolifera e invade. La cuantificación de los vasos sanguíneos en el área de tumores mamarios *in situ* tiene importancia pronóstica y está relacionada con la capacidad metastásica del tumor.

Inicialmente, el proceso metastásico se caracteriza por invasión local, con emigración local a través de la membrana basal y hacia el área del estroma. Probablemente esta transición depende de la proteólisis local y de la motilidad de las células tumorales.

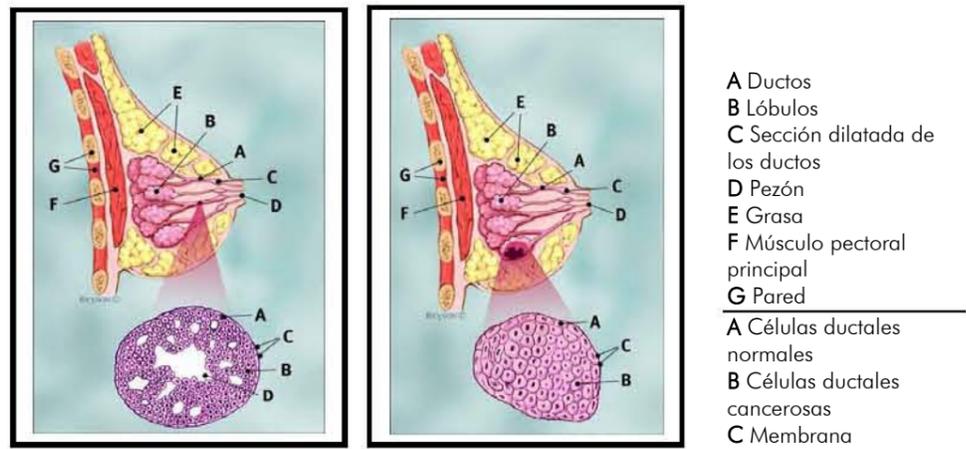
2.4 Evaluación clínica y clasificación en estadios

La evaluación previa al tratamiento de la paciente con cáncer de mama debería determinar el estadio clínico de la enfermedad e identificar las contradicciones del tratamiento conservador de la mama o de la reconstrucción inmediata de la misma. En la Tabla No. 3 se mencionan los componentes de la exploración física de la mama.

Tabla No. 3. Componentes de la evaluación clínica del cáncer de mama mediante exploración física.

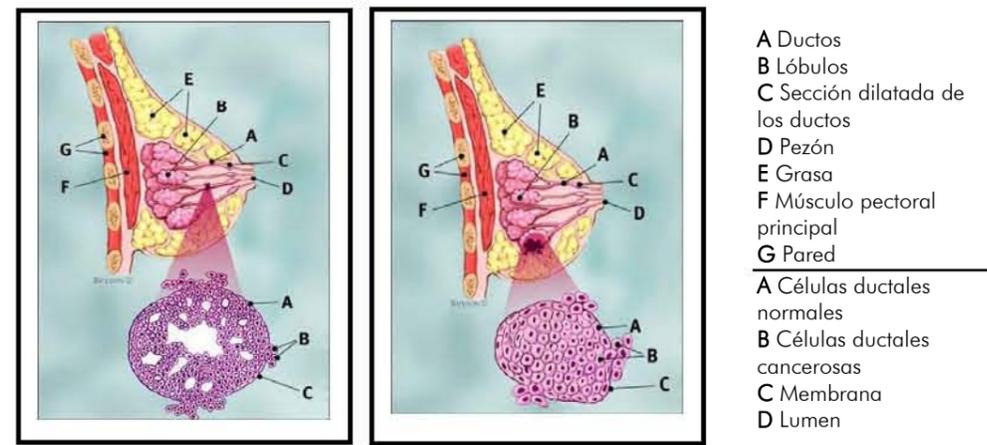
Masa en la mama	Tamaño, localización, fijación a la piel, músculo y consistencia.
Cambios de la piel	Eritema, edema, nódulos satélite y ulceración.
Cambios del pezón	Retracción, cambios del pezón y secreción.
Ganglios	Axilares, supraclaviculares, infraclaviculares.

Fig. No. 3 Carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobulillar *in situ*. Formas invasivas y no invasivas.



a) Carcinoma ductal *in situ*

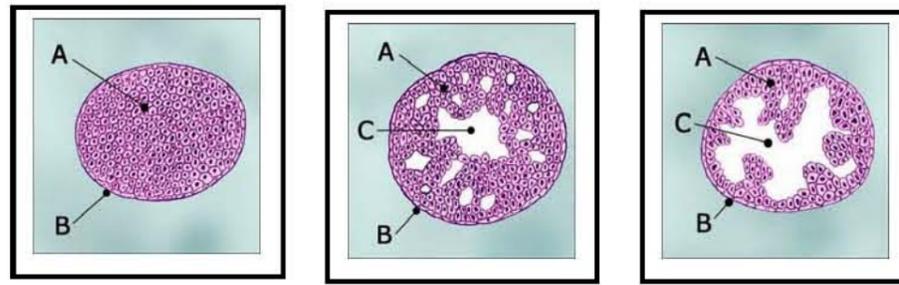
c) Carcinoma lobulillar *in situ*



b) Carcinoma ductal invasivo

d) Carcinoma lobulillar invasivo

Fig. No 4a. Subtipos de crecimiento celular no invasivo.

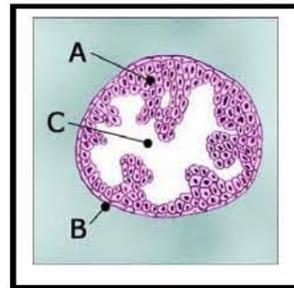


Sólido

Cribiforme

Papilar

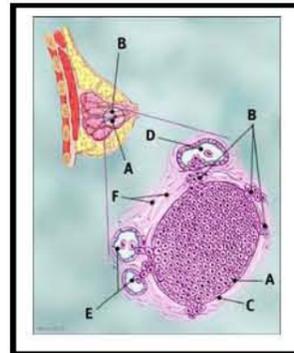
- A Células cancerosas
- B Membrana
- C Lumen



Comedo

- A Células cancerosas vivas
- B Células cancerosas muertas
- C Necrosis

Fig. No. 4b. Invasión linfática y vascular.



- A Células ductales normales
- B Células cancerosas
- C Membrana
- D Canal linfático
- E Vaso sanguíneo
- F Tejido mamario

La clasificación en estadios se refiere al agrupamiento de las pacientes según la extensión de la enfermedad. Tiene utilidad para:

- 1) determinar la elección de tratamiento de manera individualizada
- 2) para estimar su pronóstico y
- 3) para comparar los resultados de diferentes programas de tratamiento.

La clasificación en estadios se puede basar en hallazgos clínicos o anatomopatológicos. Actualmente, la clasificación en estadios de cáncer está determinada por el American Joint Committee on Cancer (AJCC). El sistema del AJCC es un sistema de clasificación en estadios clínicos y anatomopatológicos y está basado en el sistema TNM, en el que T se refiere a tumor, N a ganglios linfáticos y M a metástasis.

La IV edición, publicada en 1992,³² presenta diferencias importantes con respecto a versiones anteriores y posteriores y sus diferencias y consecuencias se comentarán más adelante. La clasificación clínica en estadios (denominada cTNM o TNM) según el sistema del AJCC de 1992, se basa en toda la información disponible inmediatamente antes de instaurar el primer tratamiento definitivo e incluye los hallazgos de la exploración física, de los estudios por imagen, los hallazgos quirúrgicos y la exploración anatomopatológica de la mama o de otros tejidos.

La extensión de tejidos sometidos a estudios anatomopatológico para la clasificación en estadios clínicos es inferior a la necesaria para la clasificación en estadios anatomopatológicos. Los hallazgos quirúrgicos adecuados para la clasificación en estadios clínicos incluyen el tamaño del tumor primario, la presencia de invasión de la pared del tórax y la presencia o ausencia de metástasis regionales o a distancia. El estadio clínico es útil para seleccionar y evaluar el tratamiento.

La clasificación en estadios anatomopatológica (que se denomina pTNM) incluye todos los datos utilizados para la clasificación clínica en estadios y la extirpación quirúrgica, y también la exploración anatomopatológica del carcinoma primario y los ganglios linfáticos axilares. Cuando después de la extirpación del carcinoma primario se demuestra la presencia de tumor en todos los márgenes de extirpación en el estudio anatomopatológico macroscópico, resulta imposible su evaluación para la clasificación en estadios anatomopatológica (pTX). Cuando se extirpan los ganglios linfáticos a un nivel inferior a los ganglios linfáticos axilares bajos (nivel 1), carece de valor para la clasificación en estadios anatomopatológica (pNX).

Tabla No. 4 Clasificación en estadios del cáncer de mama (AJCC, 1992)*

DEFINICIONES DEL TNM	
Tumor primario	
Tx	No se puede valorar el tumor primario
T0	Ausencia de indicios del tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: carcinoma intraductal, carcinoma lobulillar in situ o enfermedad de Paget del pezón sin tumor
T1	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión
T1a	0,5 cm o menos
T1b	Más de 0,5 cm, pero con un máximo de 1 cm en su mayor dimensión
T1c	Más de 1 cm, pero con un máximo de 2 cm en su mayor dimensión
T2	Tumor mayor de 2 cm, pero no superior a 5 cm en su mayor dimensión
T3	Tumor mayor de 5 cm en su mayor dimensión
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del tórax o la piel
T4a	Extensión a la pared del tórax
T4b	Edema (incluida piel de naranja), ulceración de la piel de la mama o nódulos cutáneos satélites limitados a la misma mama
T4c	Ambos (T4a y T4b)
T4d	Carcinoma inflamatorio
Afectación ganglionar regional	
Clínica	
Nx	No es posible valorar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpados anteriormente)
N0	Ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis a ganglios axilares ipsilaterales desplazables
N2	Metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijados entre ellos o a otras estructuras
N3	Metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales
Anatomopatológica	
pNx	No hay posibilidad de valorar, las metástasis a los ganglios linfáticos regionales
pN0	Ausencia de metástasis a ganglios linfáticos regionales
pN1	Metástasis a ganglios axilares ipsilaterales desplazables
pN1a	Sólo micrometástasis (ninguna de más de 0,2 cm) ¹
pN1b	Metástasis a ganglios linfáticos, alguna de más de 0,2 cm
pN1bi	Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos, alguno de más de 0,2 cm en su mayor dimensión
pN1bii	Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos, alguno de más de 0,2 cm y todos menores de 2 cm en su mayor dimensión
pN1biii	Extensión del tumor más allá de la cápsula de una metástasis ganglionar inferior a 2 cm en su mayor dimensión
pN1biv	Metástasis a un ganglio linfático de 2 cm o más en su mayor dimensión
pN2	Metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijados unos a otros o a otras estructuras
pN3	Metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales
Metástasis a distancia	
Mx	No se puede valorar la existencia de metástasis a distancia
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia (incluyendo metástasis a ganglios supraclaviculares ipsilaterales)
AGRUPAMIENTO EN ESTADIOS	
Estadio 0	Tis, N0, M0
Estadio I	T1, N0, M0
Estadio IIA	T0, N1, M0 T1, N0, M0 T2, N1, M0
Estadio IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
Estadio-III A	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
Estadio IIIB	T4, cualquier N, M0 Cualquier T, N3, M0
Estadio IV	Cualquier T, cualquier N, M1

La presencia de nódulos metastásicos en la grasa situada junto al carcinoma mamario, sin indicios de tejido ganglionar residual se considera como metástasis ganglionares regionales. El estadio anatomopatológico ofrece los datos más precisos para estimar el pronóstico y calcular los resultados finales. En la Tabla No. 4 se muestra el sistema de clasificación en estadios en su IV edición, existen varias reglas y definiciones importantes que deben utilizarse en el sistema de clasificación en estadios:

Tamaño cT. La determinación clínica utilizada para clasificar el tumor primario debería ser la que se considere más precisa. (p. ej. exploración física o mamografía)

Tamaño pT. El tamaño anatomopatológico del tumor consiste en una determinación del componente invasivo. En concreto, cuando existe un gran componente *in situ* y un componente invasivo pequeño, el tumor se clasifica según el tamaño del componente invasivo.

En el caso de varios cánceres simultáneos, infiltrantes, que se pueden medir macroscópicamente se debe utilizar la lesión de mayor tamaño para clasificar el estadio T y especificar que se trata de un caso de lesiones múltiples. Estos casos deberían analizarse por separado.

Los cánceres de mama bilaterales simultáneos deben clasificarse en estadios por separado.

La enfermedad de Paget del pezón sin masa tumoral asociada (clínica) ni carcinoma invasivo (anatomopatológica) se clasifica como Tis. Si se presenta masa o componente invasivo, se clasifica según el tamaño de la masa o del componente invasivo.

La retracción del pezón o cualquier otra alteración de la piel, excepto las que se describen en T4b y T4d, pueden aparecer en T1, T2 o T3 sin cambiar la clasificación.

La pared del tórax incluye las costillas, los músculos intercostales, pero no los músculos pectorales.

El carcinoma inflamatorio es una entidad caracterizada por induración difusa de la piel de la mama con rebordes, habitualmente sin masa subyacentepalpable.

Cuando existen dudas acerca de la categoría T, N o M correcta a la que debe asignarse un caso determinado, deberá elegirse la categoría más baja o menos avanzada.

Es importante resaltar, que el sistema del AJCC en su IV edición, presenta diferencias importantes con respecto a versiones anteriores en el sentido de que tiene en cuenta toda la información disponible antes del momento del primer tratamiento definitivo, incluyendo los hallazgos quirúrgicos y la exploración anatomopatológica de la muestra de mama extirpada con el tumor primario. En sistemas anteriores, la clasificación en estadios clínicos se limitaba a los hallazgos disponibles antes de la cirugía, como la exploración física y los estudios por imagen.

A la fecha se ha modificado el sistema hasta su VI versión (Anexo I, Tablas No. 13 y No. 14), aunque los numerosos cambios experimentados con el paso del tiempo y su complejidad han limitado mucho su utilización y su utilidad. Además, el sistema no incluye aspectos que se presentan actualmente a la hora de tomar una decisión clínica. En la práctica, la mayor parte de los especialistas utilizan simplemente el tamaño del tumor y los hallazgos histológicos de la disección axilar, que a menudo se agrupan por razones de comodidad en negativo, 1 a 3 positivos, 4 a 9 positivos y 10 o más positivos. Actualmente hay proyectos en marcha para desarrollar sistemas de clasificación en estadios más útiles.³³

Apoptosis

3.1 Historia y terminología

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen. Este fenómeno no tiene lugar de una forma aleatoria, sino que se trata de un proceso activo, bien definido genéticamente, en el que las células están destinadas a morir en un tiempo fijado. Así, los episodios que rodean a la muerte celular programada entran a formar parte de los procesos fisiológicos que resultan necesarios para el funcionamiento normal de un organismo.

Durante la historia, la muerte celular fisiológica ha sido conocida por varios nombres. Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis.

En 1879, utilizando observaciones microscópicas se introducen los términos *Karyorhesis* y *Karyolysis*, que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo. Diez años más tarde, Arnheim, propone los términos *piknosis* y marginación de la cromatina. Flemming, estudiando los folículos de los ovarios de los mamíferos, observó y describió la desaparición de células, denominando a este proceso *chromatolisis*, término que fue reutilizado por Gräper, en 1914, como antónimo de los procesos de mitosis.

Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Curie,³⁴ describieron la existencia de al menos dos formas distintas de muerte celular: la necrótica, comúnmente rápida y ocasionada por factores traumáticos y la que ellos llamaron apoptosis, la cual es más prolongada y morfológicamente distinta. Actualmente se sabe que existen una serie de diferencias morfológicas, bioquímicas y celulares entre ambos tipos de muerte, entre las que destaca la activación de las caspasas. (Tabla No. 5)

El término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas.

En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado.

El segundo tipo de muerte celular es conocido como apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos.

La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades. Las rutas apoptóticas, por tanto, intervienen en algunos procesos fisiológicos, como por ejemplo en las etapas de desarrollo donde se producen células en exceso.

Tabla No. 5.- Diferencias entre los procesos de apoptosis y necrosis.

	Necrosis	Apoptosis
Condiciones	Patológica	Fisiológica
Tamaño celular	Edema	Alteraciones patológicas
Membrana citoplasmática	Lisis, rotura	Retracción
Mitocondria	Hinchazón, rotura	Expresión de glicoproteínas
Degradación del DNA	Aleatoria	Funcional
Requerimiento energético	No	Ordenada
Reacción inflamatoria	Sí	Sí
		No

3.2 Características morfológicas y bioquímicas

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician el proceso apoptótico consiste en la pérdida de contacto con las células vecinas debido a una alteración de las moléculas de adhesión de la membrana plasmática, en el núcleo hay compactación de la cromatina, lo cual forma cúmulos densos que se segregan hacia la membrana nuclear, el DNA se fragmenta gracias a la intervención de las desoxirribonucleasas.

De manera análoga, el citoplasma se condensa y se forman vesículas o cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegidos por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico.

Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos, lo cual impide que queden libres entre las células, es por ello que una de las características fisiológicas más relevantes de la apoptosis es que no se libera material intracelular al medio intersticial (Fig. No. 5).



Fig. No. 5 Cambios morfológicos durante la apoptosis

En general, durante los procesos de muerte celular se pueden distinguir dos etapas: primero hay una fase de activación, durante la cual la célula queda comprometida a morir, seguida por una fase de ejecución, en la que se pueden observar los cambios más dramáticos de la muerte celular. Mientras que la fase de activación presenta muchas variantes, la fase de ejecución tiene características comunes en casi todos los tipos celulares. En la última etapa de esta fase se ha propuesto la participación de diferentes proteasas.

Las primeras evidencias de este tipo de muerte celular vinieron de los estudios genéticos hechos por el grupo de Horvitz en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, donde se identificó un grupo de genes cuya expresión es esencial para la apoptosis.

Entre estos el gen *ced-3* resultó codificar para una aspartil-cisteinil proteasa la cual muestra gran similitud a la proteasa del humano ICE (responsable de la maduración proteolítica de la interleucina 1 β).³⁵ Posteriormente se ha descrito una larga lista de proteasas, a las que actualmente se les denomina caspasas (cisteinil-aspartil-acid proteinases) por tratarse de proteasas ácidas que tienen un residuo de cisteína en el sitio activo y que reconocen un residuo de ácido aspártico en el sitio de corte. Como muchas otras proteasas, las caspasas están presentes en forma de zimógenos (procaspasas) hasta que una señal las activa.

Los procesos apoptóticos pueden ser activados ya sea por una inducción negativa, como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean o bien, por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas. Por otro lado, existen mecanismos que permiten al organismo dirigir a células individuales a la autodestrucción, "apoptosis instructiva", especialmente importante en el sistema inmunológico.

En células tumorales o infectadas por virus, el programa de muerte se encuentra inactivo, cuando la señal de muerte aparece en forma de un factor apoptótico el programa se activa, en respuesta a la activación de receptores específicos de membrana, como el receptor tipo 1 de TNF, APO/FAS o CD40. Por el contrario, en sistemas donde el programa se encuentra permanentemente encendido, la presencia de estos factores tróficos inactiva temporalmente el programa, sin cuando estos factores desaparecen del medio. (Tabla No. 6)

Los receptores que participan en los procesos de muerte celular se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como receptores de muerte—receptor Fas y receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)— y aquellos que desempeñan una función fisiológica, pero su sobreactivación puede conducir también a la muerte como receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje). Se encuentran localizados preferentemente en la membrana citoplasmática y establecen conexiones con el espacio extracelular recibiendo continuamente señales desde el exterior y de las células vecinas.

Tabla No. 6 Factores reguladores de la muerte celular por apoptosis

Factores de supervivencia	Factores de muerte
TGF- α , EGF, FGF-2	TNF, TGF β
Bcl-2, Bcl-X _L	Myc, p53
Estrógenos	Bcl-X _S , Bax

Los receptores de muerte se caracterizan por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio de localización citoplasmática que es el responsable de la activación de la maquinaria apoptótica. Una vez activados, los receptores transfieren la información al interior celular mediante un sistema complejo de interacciones proteína-proteína que activan diversas cascadas intracelulares. La proteína transmembrana Fas, en su porción intracelular, enlaza con FADD (*factor associated death domain*), activando las caspasas 8 y 10.

Una vez que las primeras caspasas han sido procesadas y activadas, estas desencadenan una señal en cascada activando a otras caspasas. La activación de esta cascada de amplificación trae como consecuencia la inactivación de un gran número de proteínas estructurales de señalización, reguladoras de transcripción y del metabolismo de ácidos nucleicos, que desemboca en la muerte de la célula.

Actualmente se conocen algunos mecanismos virales y celulares que inhiben a estas enzimas. El balance entre los mecanismos de activación e inhibición de las caspasas está directamente relacionado con el control de la muerte por apoptosis por lo que alteraciones en este equilibrio podrían jugar un papel importante en la aparición y evolución de enfermedades degenerativas.

Entre los segundos mensajeros que participan en los procesos de muerte celular más estudiados se encuentran el calcio y las especies reactivas del oxígeno, aunque recientemente están adquiriendo gran importancia otros como la ceramida y algunas proteínas tales como factores de transcripción (p53) y oncogenes.

La activación de estos segundos mensajeros suele conducir a la disfunción de los organelos citoplasmáticos, como la mitocondria y el retículo endoplásmico, o la regulación de la actividad de complejos enzimáticos como cinasas y fosfatasas que a su vez regulan la función de otras proteínas.

Durante el procesamiento normal de señales (la contracción de la fibra muscular o la secreción de neurotransmisores) tienen lugar aumentos transitorios de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, incrementos aberrantes pueden producir daño celular y en algunos casos su muerte.

En estos procesos, el calcio puede activar enzimas como proteasas y lipasas, induciendo la producción de radicales libres, además de regular y potenciar la expresión génica al modular la actividad de factores de transcripción. En condiciones fisiológicas, las células presentan un equilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas antioxidantes de defensa.

En algunos procesos de muerte celular se ha descrito la ruptura de este equilibrio, observándose un aumento en la oxidación de proteínas con la formación de grupos carbonilo y peroxidación lipídica, habiéndose demostrado la existencia de una localización compartimentada de derivados carbonílicos libres a partir de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos.

La ceramida empieza a ser considerada como un segundo mensajero que participa en los procesos de muerte celular. Es un glucolípido sintetizado en el retículo plasmático y en las mitocondrias, cuya mayor concentración se localiza junto a la porción interna de la membrana plasmática.

Su translocación a la mitocondria provoca cambios iónicos entre la matriz mitocondrial y el citoplasma, produciendo un descenso del potencial transmembranal mitocondrial y la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, conduciendo a la apoptosis. Los valores de ceramida pueden ser aumentados tanto por factores externos (radiación UV, agentes oxidantes), como a través de receptores de membrana (FasR y TNFR) o directamente por glucocorticoides.

Alteraciones no corregidas del DNA, en especial mutaciones cancerígenas, activan el p53 que provoca apoptosis a través de un mecanismo mediado por ceramida. Durante algunos procesos de muerte celular es necesaria la síntesis *de novo* de proteínas. Entre las familias de genes que median la destrucción controlada de la célula, destacan los conocidos como genes de respuesta inmediata, al que pertenecen proteínas como c-jun y c-fos.

La proteína p53 es un factor de transcripción que es activado en respuesta al daño en el DNA. Los aumentos en los valores de p53 conducen a la inducción en la transcripción de otros genes como p21/WAF1, un inhibidor de proteínas cinasas reguladas por ciclinas, inhibiendo la entrada en fase S del ciclo celular. El resultado neto de estas interacciones es una parada en fase G1, la cual provee de una barrera cinética en la replicación de un genoma potencialmente dañado.

Si la célula no puede reparar el daño genético, p53 induce la muerte celular por un mecanismo mediado por aumentos en la síntesis de Bax, una proteína de la familia de Bcl-2 con propiedades proapoptóticas. De esta manera, p53 se convierte en el guardián del genoma y, por extensión, del organismo, vigilando la correcta reparación de las alteraciones genéticas originadas por diversos factores externos. Un mal funcionamiento del gen p53 puede promover el desarrollo de tumores al permitir la proliferación de células que no han completado la reparación del DNA.

Una vez que la célula ha tomado la decisión de morir, en su interior se produce una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postraduccionales, es irreversible y quizás por ello es alternativamente específica. Regula fenómenos biológicos críticos en los que se ve involucrado un grupo reducido de sustrato.

3.3 Caspasas y apoptosis

Las caspasas maduras están constituidas por un dominio N-terminal, además de una subunidad grande de aproximadamente 20 kDa que contiene el sitio activo y una subunidad pequeña de 10 kDa importante para la actividad enzimática. (Fig. No. 6)

Ambas subunidades resultan de un mismo zimógeno que requiere de al menos dos cortes proteolíticos para su maduración. Tomando en cuenta la estructura primaria, se pueden agrupar en dos clases: pertenecen a la clase I las caspasas que tienen un dominio N-terminal grande, como las pro-caspasas-1, -2, -8, -9 y -10. En las pro-caspasas de clase II el dominio N-terminal es pequeño o carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas-3, -6, -7.⁴¹

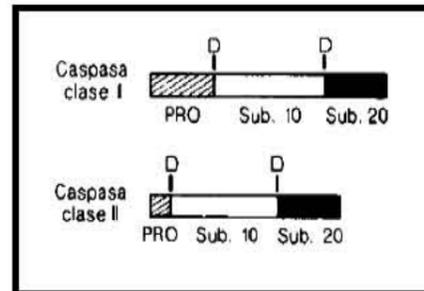


Fig. No 6. Las caspasas se sintetizan como pro-caspasas y constan de un dominio N-terminal (PRO) y dos subunidades, una grande p20 que algunas veces está separada por una secuencia espaciadora y otra menor p10. Se indica la posición de los ácidos aspárticos (D) de escisión de la pro-caspasa para activarse a caspasas.

Los dominios de las pro-caspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos.³⁷

Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico (D).

Todas estas moléculas constan de 6 alfa-hélices anfipáticas y antiparalelas las cuales están muy empaquetadas formando un centro hidrofóbico originando interacciones hidrofóbicas entre los dominios efectores de muerte (DED). La autoactivación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico.³⁸

El primer corte elimina un pro-dominio en el extremo amino del zimógeno y el segundo corte genera las dos subunidades que conforman el sitio activo.³⁹

3.3.1 Mecanismo de activación de las caspasas

Las cascadas de proteasas son sistemas de amplificación en los que un estímulo inicial activa a un zimógeno favoreciendo su maduración a una enzima activa. El primer grupo de enzimas activa a un segundo grupo de zimógenos y así sucesivamente, amplificando el estímulo.

Se han descrito tres vías de activación.⁴⁰ La primera resulta de la activación de caspasas, cascada arriba, ya sea por las mismas caspasas o por la enzima granzima B, la cual es la única proteasa de mamíferos capaz de procesar pro-caspasas de forma específica. Esta enzima es producida por los linfocitos T citotóxicos y explica en parte la alta eficiencia citotóxica de estas células.

La segunda es a través de apoptosis inducida vía receptor como ocurre al estimular receptores de la familia de receptores de citocinas parecidas al TNF.

En sus dominios de muerte acoplan a pro-caspasas vía moléculas adaptadoras. El sistema que mejor se ha caracterizado es del receptor Fas, donde la activación de los dominios de muerte causa el reclutamiento de la pro-caspasa 8. Cuando esta pro-caspasa se une al dominio de muerte de la proteína FADD que a su vez, se encuentra acoplada al receptor, la caspasa 8 es activada, probablemente por autoprociamiento.

La tercera vía por la cual las caspasas pueden ser activadas requiere de la traslocación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citoplasma y puede ocurrir en respuesta a un aumento en la producción de radicales libres (estrés oxidativo), un aumento en la concentración de calcio [Ca²⁺] en el citoplasma o la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax. Este evento es talvez una señal común en las vías apoptóticas independientes de receptor.

Una vez en el citosol, el citocromo *c* interactúa con factores activadores de apoptosis (Apaf). El complejo formado incluye a la pro-caspasa 9, la cual es entonces procesada a la forma activa por autocatálisis.

Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembranal mitocondrial, sin embargo muchos de los estímulos que conducen a la muerte celular, incluidos la lesión del DNA y la ausencia de factores de crecimiento, provocan un daño a la mitocondria y la liberación del citocromo *c* al citosol.

La función específica de la caspasa 9 es la activación de la caspasa 3 que se considera como la caspasa central en la fase de ejecución. En ambas etapas la activación de las caspasas es secuencial. (Fig. No. 7)

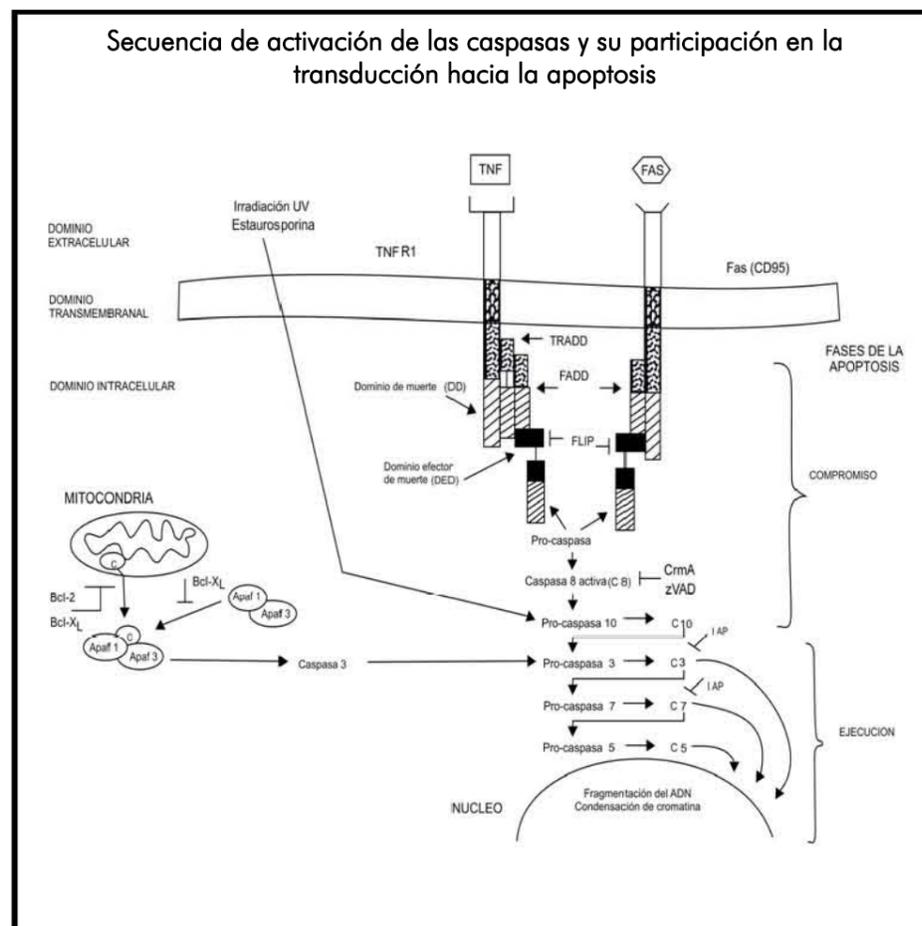


Fig. No. 7. Representación esquemática de señales apoptóticas que inducen la activación de caspasas, como drogas, agentes que dañan al DNA y factores apoptóticos como FAS o TNF (ligando), los cuales producen su señalización a través de receptores de membrana (Fas/CD95 o TNF-R1), que a su vez interactúan con proteínas intracelulares con dominios de interacción proteica denominados dominios de muerte (DD) como la proteína TRADD, y/o dominios efector de muerte (DED), como FADD y la pro-caspasa 8, finalizando con la activación de la caspasa 8 la cual puede activar a las demás caspasas conocidas por procesamiento proteolítico. La caspasa 9 es activada a través de la liberación mitocondrial de citocromo c y factores activadores de apoptosis (Apaf) que se asocian a la pro-caspasa 9. También se representan inhibidores de la apoptosis y el punto que inhiben (\perp); estas proteínas son Bcl-2, Bcl-X_L, CrmA y las IAP.

3.3.3 Sustratos celulares de las caspasas

La activación de las pro-caspasas durante la muerte celular apoptótica ha sido relacionada con el rompimiento de proteínas citoplasmáticas y nucleares. Algunos de los sustratos mejor caracterizados se han definido como proteínas estructurales, de señalización, reguladoras de transcripción o involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos.⁴¹

Durante la fase de ejecución de la apoptosis las caspasas parecen procesar a los mismos sustratos, por lo que no se sabe si *in vivo* existen caspasas específicas para un sustrato determinado.

Por otro lado, con base a la progresión de eventos hacia la muerte celular podríamos categorizar a los sustratos de las caspasas en tres grupos:

- a) otras caspasas
- b) proteínas celulares que necesitan ser inactivadas para que la muerte celular ocurra
- c) proteínas celulares cuya activación es requerida para la ejecución de la muerte celular

3.3.4 Inhibidores de caspasas

La identificación de proteasas específicas involucradas en vías apoptóticas dependientes del receptor TNF-R1 o FAS se ha facilitado con la identificación de inhibidores de la muerte celular de origen viral y celular, así como con el uso de inhibidores sintéticos. Los inhibidores de caspasas identificados en estos experimentos, corresponden a productos de genes virales que previenen la muerte de la célula hospedera y cuyos productos inhiben de forma efectiva la apoptosis.

CrmA es una proteína perteneciente al grupo de inhibidores de serinil proteasas (serpinas) que pueden bloquear la muerte celular apoptótica mediada por TNF-R1 o FAS mediante la formación de un complejo estable con diferentes tipos de caspasas. Actualmente se sabe que CrmA tiene la capacidad de bloquear la muerte celular programada de manera muy efectiva al inhibir la caspasa 8 aún a bajas concentraciones.

La caspasa 8 puede auto procesarse proteolíticamente y así, procesar a otras caspasas, además se encuentra en el ápice de la cascada apoptótica siendo la primera caspasa en activarse cuando se estimula a las células con TNF o FAS. Por lo tanto, la inhibición por CrmA en la vía apoptótica mediada por FAS o TNF se debe a la inhibición de la actividad enzimática de la caspasa 8.

Existe una nueva familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) las cuales son clave para la regulación de la apoptosis en diversos fenómenos biológicos, como en la resistencia a las terapias contra el cáncer. Actualmente se

han identificado cinco miembros altamente conservados durante la evolución, entre los cuales destacan IAP-1, IAP-2 y la survivina. Las IAP son una familia de proteínas antiapoptóticas cuya selectividad, sugiere que pueden bloquear algunas vías apoptóticas pero no todas.

La IAP1 y 2 inhiben la activación de las caspasas efectoras, también son capaces de inhibir la activación de la procaspasa-9 inducida por el citocromo *c*, lo que previene la activación de las caspasas 3, 6 y 7. (Fig. No. 8)

Con el propósito de distinguir una caspasa de otra y así poder establecer su orden de activación se sintetizaron algunos péptidos con fluoro metil cetona (fmk), un inhibidor específico de las caspasas y con el grupo funcional amino metil cumarina (amc), que al ser escindido del péptido, fluoresce evidenciando la actividad de las caspasas.

Estos péptidos son hidrosolubles, relativamente estables y generalmente pequeños; sus secuencias están basadas en los sitios de reconocimiento de los diferentes tipos de caspasas por sus sustratos.

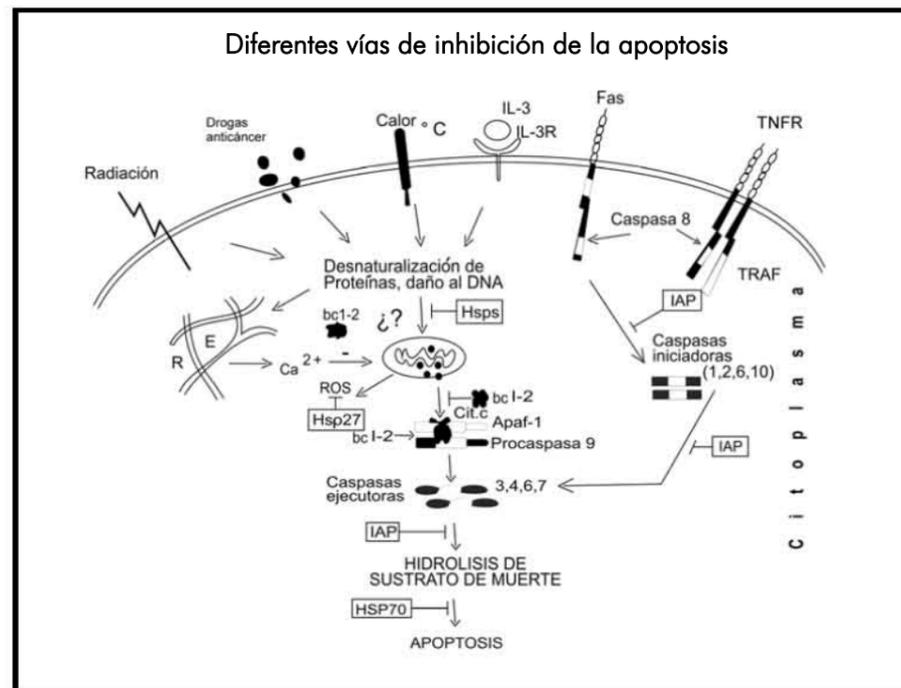


Fig. No. 8. Existen proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), proteínas de choque térmico (Hsps), proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, BclXL) que pueden bloquear la apoptosis en diferentes sitios.

3.4 Genes involucrados en la apoptosis

En algunos casos se ha determinado una participación de estas proteínas en procesos patológicos, este es el caso de la survivina, que se expresa en condiciones fisiológicas en el tejido fetal y no en el tejido adulto diferenciado, pero existen líneas celulares de tumores malignos que la expresan *de novo*. Estas moléculas podrían convertirse en marcadores moleculares importantes o blancos terapéuticos en terapias contra el cáncer.

3.4.1 *bcl-2*

El gen *bcl-2* (B cell leukemia/lymphoma 2) fue el primer protooncogén detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B.

La familia Bcl-2 está ampliamente distribuida en distintos tipos celulares, estas proteínas se pueden localizar predominantemente en la parte externa de la membrana mitocondrial del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear.

Durante la maduración de las células B puede ocurrir una translocación cromosómica 14,18 en la región donde está el gen *bcl-2*; ello provoca un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis en células B y da por resultado la supervivencia de la célula transformada.⁴²

Está demostrado que la sobreexpresión del gen *bcl-2* en linfomas inducidos experimentalmente, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis.⁴³ Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas que pueden conducir a la progresión maligna.^{44,45} La expresión de este gen en algunos tipos de cáncer es un marcador de mal pronóstico.⁴⁶

El gen *bcl-2* forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia de genes de *bcl-2* son: *bcl-2*, *bax*, *bad*, *bcl-X_L*, *mcl-1*, entre otros.

El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis.^{47,48}

Bcl-2 puede prevenir la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citoplasma o al medio externo. La liberación del citocromo *c* (Apaf-2), es esencial para la activación de las caspasas de ejecución. La presencia de Bcl-2 en la membrana mitocondrial ha llevado a pensar que puede bloquear directa o indirectamente la liberación del citocromo *c*. (Fig. No. 9)

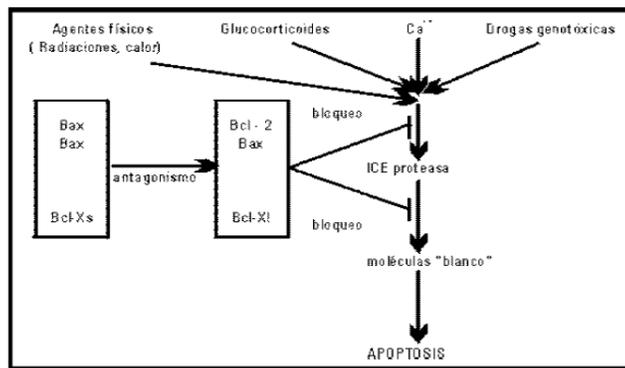


Fig. No. 9. Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2. El heterodímero Bcl-2-Bax y la variante Bcl-X_L tienen efecto inhibitorio de la muerte celular, al impedir la acción de las proteasas cisteínas que median señales de apoptosis. Sin embargo, la formación de homodímeros Bax-Bax, así como elevados niveles de Bax o Bcl-Xs, pueden favorecer la muerte programada de la célula.

Además del citocromo *c* se sabe que para la activación de la caspasa 3 se requiere de otros factores citosólicos que inicialmente fueron designados como factores activadores de proteasas apoptóticas. De hecho, basado en su función, el citocromo *c* fue designado como Apaf-2 y recientemente el factor denominado como Apaf-1 se ha identificado como el homólogo de *ced-4* de *C. elegans*, mientras que un tercer elemento llamado Apaf-3 corresponde a la procaspasa 9.

3.4.2 Otros genes

Es conocido que ciertos oncogenes y genes supresores de tumor influyen en el mecanismo de muerte celular programada; tal es el caso de los genes *c-myc* y *nur-77*,⁴⁹ que a pesar de estar asociados con la progresión del ciclo celular participan en la inducción de apoptosis en algunas células, también se encuentra el gen *bcl-2* que como ya ha sido descrito, bloquea la apoptosis cuando es sobreexpresado y el gen *p53*, cuyo requerimiento se produce en casos de daño genómico.

La expresión de estos genes puede inducir a algunos tipos de cáncer a la apoptosis. Esto sugiere que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la transformación maligna.⁵⁰

El gen *p53* ha sido llamado guardián del genoma por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del DNA antes de que se replique. Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el DNA ha sido sustancial. En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobreexpresión de *p53* conduce directamente a la apoptosis.⁵¹

La pérdida de la función normal del gen *p53* puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a mutaciones en *p53*). Hay evidencias que hacen pensar que el alto riesgo de la transformación maligna en ausencia de *p53* funcional, probablemente origina una oportunidad reducida de reparar el DNA y una incapacidad de eliminar por apoptosis la célula dañada no reparada. Aunque es desconocida la base real de la apoptosis inducida por este gen.⁵²

Otro regulador fisiológico del ciclo celular que participa en la apoptosis es la proteína Myc, que es producto del protooncogén *c-myc*. La sobreexpresión del gen *c-myc* pudiera resultar en mitosis o apoptosis en dependencia de la disponibilidad de otros factores que estimulan el crecimiento celular. De esta forma la expresión incrementada de Bcl-2 en presencia de un aumento de *c-myc* provoca una inhibición de la apoptosis mediada por *c-myc*, lo que explica la cooperación que se produce entre ambos genes en el origen de las neoplasias.

Mcl-1

4.1 Características generales

Mcl-1 es una proteína de la familia Bcl-2 que actúa en el control de la apoptosis, promoviendo la supervivencia de la célula al interferir en una etapa temprana de la cascada de eventos que llevan a la liberación del citocromo *c* de la mitocondria. Mcl-1 tiene una vida media corta y es una proteína altamente regulada inducida por un amplio rango de señales de supervivencia y también rápidamente desregulada durante la apoptosis. Mcl-1 puede incluso ser hidrolizada por las caspasas durante la apoptosis para producir una molécula promotora de la muerte celular.⁵³

Los múltiples niveles de control de la expresión de Mcl-1 sugieren que Mcl-1 juega un papel importante al controlar las decisiones de vida y muerte en respuesta a los rápidos cambios de su ambiente y Mcl-1 es necesaria para el desarrollo embrionario y para la función del sistema inmune. La expresión de Mcl-1 puede ser útil en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

La familia Bcl-2 comprende proteínas que son reguladores clave de la supervivencia celular que pueden suprimir (Bcl-2, Bcl-X_L) o promover (Bad, Bax) la apoptosis. Una amplia variedad de estímulos apoptóticos disparan la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo *c* de la mitocondria, lo que resulta en la activación de las caspasas. La hidrólisis de ciertas proteínas que actúan como sustratos por medio de las caspasas lleva al proceso morfológico y bioquímico de la apoptosis y aquellas proteínas que están relacionadas a Bcl-2 parecen modular la apoptosis al regular la liberación del citocromo *c*. Mcl-1 es un miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2, originalmente identificado en 1993 en las células mieloides diferenciadas.

4.2 Estructura

4.2.1. Mcl-1 L, Mcl-1 S

El gen *mcl-1* (Fig. No. 10) en el humano está localizado en el cromosoma 1q21.

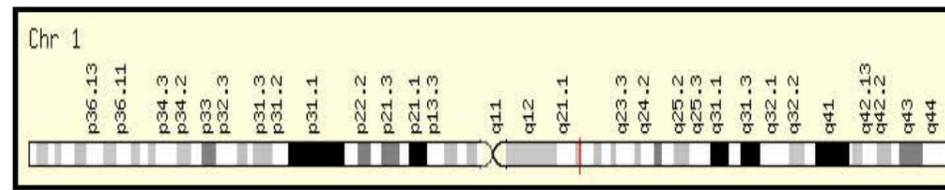


Fig. No. 10. Localización de *mcl-1*. Cromosoma 1q21.

La proteína Mcl-1- en ocasiones conocida como Mcl-1L (Fig. No. 11), comprende 350 residuos de aminoácidos y contienen regiones que son similares a las de otras proteínas de la familia Bcl-2, denominadas dominios BH (Homólogos Bcl-2).⁵⁴ Los dominios BH son sitios cortos que median las interacciones proteína-proteína y son importantes para la regulación de la apoptosis.

Mcl-1 contiene los dominios BH1, BH2 y BH3 pero carece del dominio BH4 N-terminal, presente en Bcl-2 y Bcl-X_L. (Fig. No. 13) Al igual que muchas otras familias protéicas, Mcl-1 también contiene un dominio transmembranal (TM) en la región C-terminal que es útil para localizar a Mcl-1 en la membrana intracelular, principalmente en la membrana mitocondrial exterior. Esta ubicación es consistente con el papel de Mcl-1 en el control de eventos mitocondriales clave durante la apoptosis.

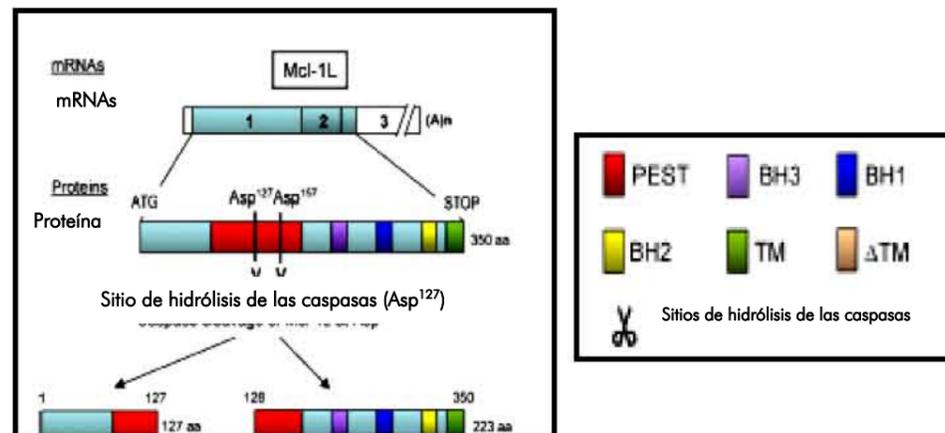


Fig. No.11. Mcl-1 L. Se muestran los sitios de corte de las caspasas, así como los dominios de interés de la proteína.⁵³

Las regiones N-terminales de Mcl-1 contienen dos dominios PEST, ricos en residuos de los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina.

Los dominios PEST son comúnmente encontrados en proteínas que sufren cambios repentinos y Mcl-1 tiene una vida media corta en las células (aproximadamente de una a un par de horas).⁵⁵ La degradación por la vía proteasoma parece ser la ruta principal para los rápidos cambios que sufre Mcl-1.

Por medio de empalme alternativo de Mcl-1, se genera una segunda isoforma que carece del exón 2 denominada Mcl-1 Δ TM.

Posee 271 aminoácidos y las regiones N-terminales de esta isoforma incluyendo los dominios PEST y BH3 son idénticos a Mcl-1 Δ L, pero Mcl-1 Δ TM, carece de los dominios BH1 y BH2, así como del dominio TM. (Fig. No. 12)

Aunque la importancia de esta isoforma aún esta por determinarse, la estructura de Mcl-1 Δ TM es semejante a ciertas proteínas proapoptóticas que sólo poseen al dominio BH3 y, en marcado contraste a Mcl-1 Δ L, la sobreexpresión de Mcl-1 Δ TM promueve la muerte celular.

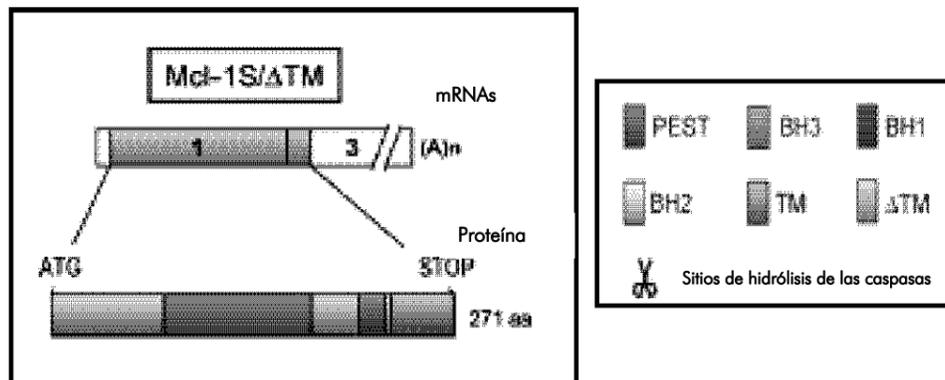


Fig. No. 12. Mcl-1 Δ S. Variante que surge por empalme alternativo. Carece del dominio transmembranal, así como de los dominios BH1 y BH2; se desconoce el sitio de hidrólisis de las caspasas.⁵³

Otras isoformas de Mcl-1 pueden ser detectadas mediante técnicas como inmunotransferencia, mismas que pueden ser el resultado de la fosforilación y/o la hidrólisis por medio de las caspasas; sin embargo y a excepción de aquellas que pueden sufrir hidrólisis por las caspasas, éstas aún no se conoce su función.

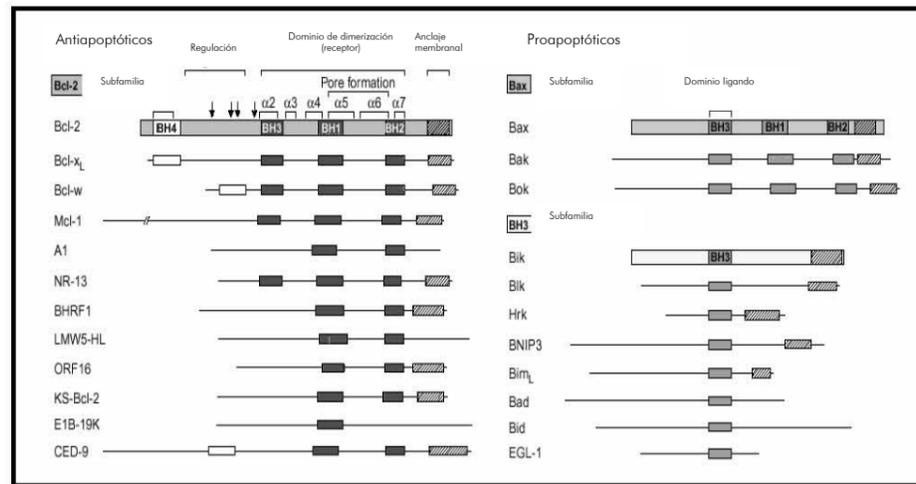


Fig. No. 13. Familia Bcl-2; miembros antiapoptóticos y proapoptóticos. Se representa la ausencia o presencia de dominios de interés.⁵⁶

4.3 Síntesis y degradación

Mcl-1 se expresa en una amplia variedad de células, en el adulto y durante el desarrollo embrionario con variaciones específicas en los niveles de expresión. (Fig. No. 14) Altos niveles de Mcl-1 son detectados en las capas apicales del epitelio que se encuentran ampliamente diferenciadas (próstata, mama, pulmón). Mientras que la expresión de Bcl-2 tiende a ser más alta en las capas basales de la célula.⁵⁷ En el sistema linfóide, Mcl-1 se expresa abundantemente en el compartimiento germinal de las células B, en contraste a Bcl-2 que se encuentra en células B clonadas seleccionadas de la zona manto. Estas diferencias sugieren funciones únicas para Mcl-1 y Bcl-2 en el control de la apoptosis

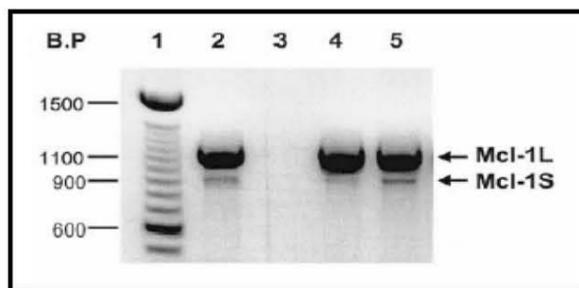


Fig. No. 14. Amplificación de los transcritos "L" y "S" expresados en células de placenta humana y leucemia mieloide. En el carril 1, se muestra el marcador de peso molecular, mientras que los carriles 2, 4 y 5 representan los amplificadores de cDNA en placenta humana, en Hs 732.P1 -una línea celular de placenta- y en K-562-línea celular correspondiente a leucemia mieloide. El carril 3, es un control negativo.⁵⁸

. La expresión de Mcl-1 está altamente inducida por señales de supervivencia y diferenciación tales como las citocinas y factores de crecimiento. MAPK, P13K, y JAK se ven implicados en la estimulación de la transcripción de Mcl-1, actuando por medio de elementos que responden a factores de transcripción específicos en el promotor de Mcl-1. Sin embargo, la fosforilación directa de Mcl-1 también juega un papel importante en el control de la función y expresión de Mcl-1.

La expresión de Mcl-1 es desregulada durante la apoptosis en muchos sistemas celulares, en ocasiones en contraste a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L. La hidrólisis mediada por las caspasas puede contribuir a esta desregulación en la expresión de Mcl-1 ya que las caspasas (en particular, caspasas efectoras como la caspasa 3) pueden hidrolizar a Mcl-1 a partir de 2 residuos de ácido aspártico. (Asp¹²⁷ y Asp¹⁵⁷). Estos residuos se encuentran dentro de los dominios PEST.

En las células el Asp¹²⁷ puede ser el sitio preferido para llevar a cabo la hidrólisis. El fragmento N-terminal que resulta de la hidrólisis, es una proteína que promueve potentemente la muerte celular; por tanto la hidrólisis de Mcl-1 por medio de las caspasas priva a las células de una molécula de supervivencia y genera una efectiva célula asesina.

Si se da un decremento en la actividad del promotor o de la traducción se puede contribuir también a la desregulación o subexpresión de Mcl-1 durante la apoptosis.

4.4 Funciones biológicas

La rápida inducción y degradación de Mcl-1 sugiere que juega un importante papel en el control de la apoptosis en múltiples células en respuesta a rápidas señales de cambio en el ambiente. Mcl-1 es esencial para la embriogénesis y para el desarrollo y mantenimiento de ambos, linfocitos B y T. Mcl-1 también tiene una función importante en la supervivencia de las células malignas ya que el agotamiento (carencia) de Mcl-1 vía oligonucleótidos antisentido dispara la apoptosis en células cancerígenas.

El mecanismo molecular exacto por medio del cual Mcl-1 promueve la muerte celular no se ha descifrado aún por completo, pero se cree que involucra la supresión de la liberación del citocromo *c* de la mitocondria, posiblemente via heterodimerización o neutralización con otros miembros pro-apoptóticos de la familia bcl-2. (Bim o Bak).

Resulta de interés que Mcl-1 module eventos tempranos en la cascada que implica la liberación del citocromo *c* de la mitocondria. Sin embargo, por lo menos en algunos sistemas, la rápida desregulación en la expresión de Mcl-1 puede ser requerida para dar inicio a la cascada de eventos que ocurren durante la apoptosis.

Además de sus funciones que promueven la supervivencia, Mcl-1 puede desempeñar una función positiva en la apoptosis. La proteína promotora de la muerte celular que resulta de la hidrólisis de las caspasas puede participar en una curva de retroalimentación positiva que induzca a la posterior activación de las caspasas.⁵⁹

Es posible que Mcl-1 tenga funciones adicionales que le permitan impedir directamente la diferenciación celular y el control del ciclo celular. Por ejemplo, Mcl-1 se une a PCNA causando la detención del ciclo celular mientras que la transcripción del factor E2F1 (regulador del ciclo celular) reprime la expresión de Mcl-1.

4.5 Localización intracelular y asociación membranal de Mcl-1

Al estudiar la localización intracelular de Mcl-1, así como la cinética de su expresión durante la diferenciación, se deduce que la distribución intracelular de Mcl-1 coincide en parte con la de Bcl-2. Mcl-1 es similar a Bcl-2 en que la proteína Mcl-1 se localiza principalmente en la mitocondria, además de que se asocia con membranas por medio de su región carboxil hidrofóbica.⁶⁰

Mcl-1 difiere de Bcl-2 en su distribución relativa en otros compartimientos (no mitocondrial/membrana pesada). Mcl-1 también es abundante en la porción ligera de la membrana de células ML-1 inmaduras mientras que Bcl-2 es abundante en la región nuclear.

La proteína Mcl-1 aumenta rápidamente mientras las células inician su diferenciación, además de que se considera una proteína lábil. En contraste, Bcl-2 desaparece gradualmente mientras las células completan su proceso de diferenciación.

La porción carboxilica de Mcl-1 tiene secuencia similar a Bcl-2. En el extremo carboxilo terminal, ambos Mcl-1 y Bcl-2 tienen un estrecho hidrofóbico (19-20 aminoácidos), en Bcl-2 este estrecho media la asociación de la proteína con las membranas.

Inicialmente, la localización de Bcl-2 fue reportada en las membranas mitocondriales y desde entonces, también ha sido localizado en otros compartimientos que contengan membrana intracelular, incluyendo el retículo endoplásmico y las envolturas nucleares. Datos recientes reportan que Bcl-2 se asocia con la membrana mitocondrial externa y que es flanqueado ahí por el extremo carboxilo terminal. Bcl-2 tienen una función importante que es la de inhibir la muerte celular.⁶⁰ Esto puede observarse en líneas celulares dependientes de factores de crecimiento, donde la inducción exógena de Bcl-2 inhibe la apoptosis producida por la privación de factores de crecimiento. De manera similar, Bcl-2 puede inhibir la muerte celular causada por ciertos agentes citotóxicos o por productos génicos inductores de apoptosis como c-myc.

La función de Bcl-2 al inhibir la muerte celular es también llevada a cabo *in vivo*; en ratones que carecen de Bcl-2 el sistema linfóide aparenta funcionar normalmente en el nacimiento, pero subsecuentemente se colapsa debido a la apoptosis de las células linfoides. Finalmente, el patrón exógeno de expresión de Bcl-2 refleja su función en la supresión de la apoptosis. Por ejemplo, Bcl-2 no se expresa en la mayoría de los timocitos inmaduros (CD4⁺, CD8⁺) que son susceptibles a muerte celular programada; sin embargo, Bcl-2 se expresa en aquellas células que sobreviven y que continúan diferenciándose.

Así como *mcl-1*, otros genes de la familia *bcl-2* muestran relación en la secuencia de la región carboxilo, aunque los sitios intracelulares de acción de muchas de estas proteínas aún no han sido completamente elucidados, algunos, como Mcl-1 y Bcl-2 causan un aumento de la viabilidad celular bajo condiciones inductoras de apoptosis, mientras que otros causan la inhibición (Bax).

En contraste a la similitud de la secuencia de la región carboxilo entre Mcl-1 y Bcl-2, Mcl-1 difiere de Bcl-2 y de otros miembros de la familia Bcl-2 en su región amino-terminal. Una diferencia es que el extremo amino terminal de Mcl-1 tiene una secuencia parcial. Mcl-1 puede ser procesado por el retículo endoplásmico. Una segunda diferencia entre Mcl-1 y Bcl-2 es que Mcl-1 contiene dominios PEST. Mcl-1 es una proteína lábil, Bcl-2 no; puesto que su vida media es de 10-14 hrs.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- El cáncer de mama constituye una de las primeras causas de muerte entre las mujeres mexicanas y del mundo. Como en otros cánceres su desarrollo depende de un balance inadecuado en la renovación celular, debido a una proliferación excesiva o a alguna falla en la mortalidad celular fisiológica. Esta etapa es crítica al permitir la supervivencia prolongada e incontrolada de las células neoplásicas y depende de la alteración de los mecanismos genéticos de control (antioncogenes, reguladores de apoptosis, etc). Aún se desconocen muchos de los mecanismos reguladores relacionados con la muerte celular programada y el desarrollo del cáncer mamario; por tanto resulta de interés determinar si la presencia o ausencia de las variantes apoptótica y antiapoptótica del gen *mcl-1*, se relaciona con la progresión de dicha neoplasia.

JUSTIFICACIÓN

- Mediante estudios previos de microarreglos, el producto del gen *mcl-1* se encontró subexpresado en un alto porcentaje de tumores mamarios esporádicos de mujeres mexicanas.⁶¹ (Anexo I, Fig. No. 20) Sin embargo no se estableció cual de las isoformas del gen presentó ese comportamiento, por lo que en este trabajo se busca analizar la presencia o ausencia de las isoformas *L* y *S* en tumores mamarios de mujeres mexicanas. La información obtenida permitirá caracterizar la participación de cada variante en el proceso de muerte celular programada en esta patología tan frecuente en nuestra población; así como eventualmente determinar su posible papel como biomarcadores de riesgo.

HIPÓTESIS

- Dado que Mcl-1 *L* posee actividad antiapoptótica y que el proceso de muerte celular programada se ve disminuido o afectado en este tipo de patologías, ésta variante se encontrará sobre expresada respecto a Mcl-1 *S*, isoforma que incluso podría sufrir un bloqueo total de su acción por el efecto de Mcl-1 *L*.
- Por tanto, Mcl-1 *S*, debe presentar una disminución en su actividad o bien se encontrará apagada.
- En los tumores correspondientes a estadios más avanzados, la variante antiapoptótica será dominante.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia o ausencia de los transcritos de las isoformas *L* y *S* del gen *mcl-1* en tumores mamarios esporádicos en diferentes estadios de mujeres mexicanas.
- Relacionar los resultados obtenidos con las características clínicas de las pacientes.

JUSTIFICACIÓN

- Mediante estudios previos de microarreglos, el producto del gen *mcl-1* se encontró subexpresado en un alto porcentaje de tumores mamarios esporádicos de mujeres mexicanas.⁶¹ (Anexo I, Fig. No. 20) Sin embargo no se estableció cual de las isoformas del gen presentó ese comportamiento, por lo que en este trabajo se busca analizar la presencia o ausencia de las isoformas *L* y *S* en tumores mamarios de mujeres mexicanas. La información obtenida permitirá caracterizar la participación de cada variante en el proceso de muerte celular programada en esta patología tan frecuente en nuestra población; así como eventualmente determinar su posible papel como biomarcadores de riesgo.

HIPÓTESIS

- Dado que Mcl-1 *L* posee actividad antiapoptótica y que el proceso de muerte celular programada se ve disminuido o afectado en este tipo de patologías, ésta variante se encontrará sobre expresada respecto a Mcl-1 *S*, isoforma que incluso podría sufrir un bloqueo total de su acción por el efecto de Mcl-1 *L*.
- Por tanto, Mcl-1 *S*, debe presentar una disminución en su actividad o bien se encontrará apagada.
- En los tumores correspondientes a estadios más avanzados, la variante antiapoptótica será dominante.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia o ausencia de los transcritos de las isoformas *L* y *S* del gen *mcl-1* en tumores mamarios esporádicos en diferentes estadios de mujeres mexicanas.
- Relacionar los resultados obtenidos con las características clínicas de las pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó RNA extraído de muestras de tumores mamarios de mujeres mexicanas, captadas del Hospital Juárez de México y que corresponden a adenocarcinomas esporádicos y dos tumores filoides, sin tratamiento previo. Las muestras fueron seleccionadas en base al estadio, concentración del RNA e integridad del mismo.

Extracción de RNA a partir de tejido tumoral

Se cortó un fragmento de tejido mamario en un criotubo previamente pesado y por diferencia se obtuvo el peso del tejido.

Se maceró el tejido mamario manteniéndolo en nitrógeno líquido y/o hielo seco.

Se añadieron 200 a 1000 μL de trizol (dependiendo del peso) y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 200 μL de cloroformo homogeneizando vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente de 2 a 5 minutos.

Se centrifugó 15 minutos a 2 000 rpm y a temperatura de 4°C

Se recuperó la fase acuosa (sobrenadante) y se agregó isopropanol frío (v:v) para precipitar.

Se centrifugó a 7 500 rpm y a 4°C, 5 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se recuperó el botón.

Se dejó secar a temperatura ambiente y se hidrató con 20 a 50 μL de agua DEPC.

La concentración de RNA en $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ se determinó mediante espectrofotometría a 260 ηm y 280 ηm y a una densidad óptica de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tomando alícuotas de 2 μL de RNA total mezclados con 98 μL de agua. La integridad del RNA fue verificada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Diseño de oligonucleótidos

Para cada isoforma se diseñaron oligonucleótidos específicos con los programas Oligo y DNAMAN, a partir de las secuencias publicadas en el GeneBank⁶² y cuyos números de acceso son NM 021960, para la variante Mcl-1 L y NM 182763 para Mcl-1 S, respetando para cada par de oligonucleótidos las condiciones de diseño. (Tabla No. 7)

Mcl-1 L
ORIGIN

```

1 atgtttggcc tcaaaagaaa cgcggtaatc ggactcaacc tctactgtgg gggggccggc
61 ttgggggccc gcagcggcgg cgcaccgccg ccgggagggc gacttttggc tacggagaag
121 gaggcctcgg ccggcgaga gataggggga ggggagccg gcgcggtgat tggcggaaag
181 gccggcgcaa gcccccgtc caccctcacg ccagactccc ggagggtcgc gcggccgccc
241 cccattggcg ccgaggtccc cgacgtcacc gcgacccccg cgaggctgct tttcttcgcg
301 cccaccgccg gcgcgcgccc gcttgaggag atggaagccc cggccgctga cccatcatg
361 tcgcccgaag aggagctgga cgggtacgag ccggagcctc tcgggaagcg gccggctgtc
421 ctgcccgtgc tggagttggt cggggaatct ggtaataaca ccagtacgga cgggtcacta
481 ccctcgacgc cgcgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccggca gtcgctggag
541 attatctctc ggtaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa gccaatgggc
601 aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgtg gagaccttac gacgggttgg ggatggcgtg
661 cagcgcaacc acgagacggc cttccaagga atgcttcgga aactggacat caaaaacgaa
721 gacgatgtga aatcgttgtc tcgagtgatg atccatgttt tcagcgacgg cgtacaacac
781 tggggcagga ttgtgactct catttctttt ggtgcttttg tggctaaaca cttgaagacc
841 ataaaccaag aaagctgcat cgaaccatta gcagaaagta tcacagacgt tctcgttaagg
901 aaaaaacggg actggctagt taaacaaaga ggctgggatg ggtttgtgga gttcttccat
961 gtagaggacc tagaaggtgg catcaggaat gtgctgctgg cttttgcagg tgttgcggga
1021 gtaggagctg gtttgcaata tctaataaga tag
//
Exón 1 Exón 2 Exón 3

```

Las secuencias sombreadas ejemplifican los oligonucleótidos sintetizados con los que se obtiene un amplificado de 487 bp. Este primer par de iniciadores amplifica los exones 1 y 2 de la variante antiapoptótica.

Mcl-1 S
ORIGIN

```

1 atgtttggcc tcaaaagaaa cgcggtaatc ggactcaacc tctactgtgg gggggccggc
61 ttgggggccc gcagcggcgg cgcaccgccg ccgggagggc gacttttggc tacggagaag
121 gaggcctcgg ccggcgaga gataggggga ggggagccg gcgcggtgat tggcggaaag
181 gccggcgcaa gcccccgtc caccctcacg ccagactccc ggagggtcgc gcggccgccc
241 cccattggcg ccgaggtccc cgacgtcacc gcgacccccg cgaggctgct tttcttcgcg
301 cccaccgccg gcgcgcgccc gcttgaggag atggaagccc cggccgctga cccatcatg
361 tcgcccgaag aggagctgga cgggtacgag ccggagcctc tcgggaagcg gccggctgtc
421 ctgcccgtgc tggagttggt cggggaatct ggtaataaca ccagtacgga cgggtcacta
481 ccctcgacgc cgcgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccggca gtcgctggag
541 attatctctc ggtaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa gccaatgggc
601 aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgtg gagaccttac gacgggttgg ggatggcgtg
661 cagcgcaacc acgagacggc cttccaagga tgggtttgtg gagttcttcc atgtagagga
721 cctagaaggt ggcacagga atgtgctgct ggcttttgca ggtgttgcgt gagtaggagc
781 tggtttgca tatctaataa gatagcctta ctgtaa
//
Exón 1 Exón 3

```

Las secuencias sombreadas ejemplifican los oligonucleótidos sintetizados con los que se obtiene un amplificado de 329 bp. Este segundo par de iniciadores amplifica los exones 1 y 3 de la variante proapoptótica.

Se construyó también un juego de oligonucleótidos que permitiera observar la presencia de ambas isoformas-en caso de existir-en un mismo carril en los geles de agarosa al realizar la electroforesis. Si ambas isoformas están presentes en una muestra se obtendrían además de los dos amplificadores anteriores, uno más de 583 bp que confirmaría la presencia de la variante antiapoptótica, amplificando ésta desde su primer exón hasta el tercero.

Mcl-1 L
ORIGIN

```

1 atgtttggcc tcaaaagaaa cgcggtaatc ggactcaacc tctactgttg gggggcggc
61 ttgggggccc gcagcggcgg cgcaccgcgc ccgggagggc gacttttggc tacggagaag
121 gaggcctcgg ccggcggaga gataggggga ggggagggcg gcgcggtgat tggcgggaagc
181 gccggcgcaa gcccccgtc caccctcacg ccgactccc ggagggtcgc cggcccgccg
241 cccattggcg ccgaggtccc cgaogtcacc gcgacccccg cgaggctgct tttcttcgcg
301 cccacccgcc gcgcgcgccc gcttgaggag atggaagccc cggccgctga ccccatcatg
361 tcgccgaag aggagctgga cgggtacgag ccggagcctc tcgggaagcg gccggctgtc
421 ctgcccgtgc tggagttggc cggggaatct ggtaataaca ccagtacgga cgggtcacta
481 ccctcgacgc cgcgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccgca gtcgctggag
541 attatctctc gttaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa gccaatgggc
601 aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgctg gagaccttac gacgggttgg ggatggcgtg
661 cagcgcaacc acgagacggc cttccaagcc atgcttcgga aactggacat caaaaacgaa
721 gacgatgtga aatcgttgtc tcgagtgatg atccatgttt tcagcgacgg cgtaacaaac
781 tggggcagga ttgtgactct catttctttt ggtgcctttg tggctaaaca cttgaagacc
841 ataaaccaag aaagctgcat cgaaccatta gcagaaagta tcacagacgt tctcgttaagg
901 acaaaacggg actggctagt taaacaaaga ggctgggatg ggtttggtga gttcttccat
961 gtagaggacc tagaaggtgg catcaggaat gtgctgctgg cttttgcagg tgttgctgga
1021 gtaggagctg gtttggcata tctaataaga tag

```

//

Exón 1 Exón 2 Exón 3

Tabla No. 7. Secuencia, tamaño de los amplificadores y ubicación de los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Amplificado (bp)	Tm
mcl-1 F mcl-1 LR	5' TGGAGTTGGTCGGGGAATCT 3' 5' AGCCAGTCCCGTTTTGTCCT 3'	Ex 1, Iso L Ex 2, Iso L	487 bp 58 °
mcl-1 F mcl-1 SR	5' TGGAGTTGGTCGGGGAATCT 3' 5' GCAAAAGCCAGCAGCACATT 3'	Ex 1, Iso S Ex 2, Iso S	329 bp 59.3 °
mcl-1 F mcl-1 CI	5' TGGAGTTGGTCGGGGAATCT 3' 5' ACACCTGCAAAAGCCAGCAG 3'	Ex 1, Iso L Ex 3, Iso L	583 bp 58 °

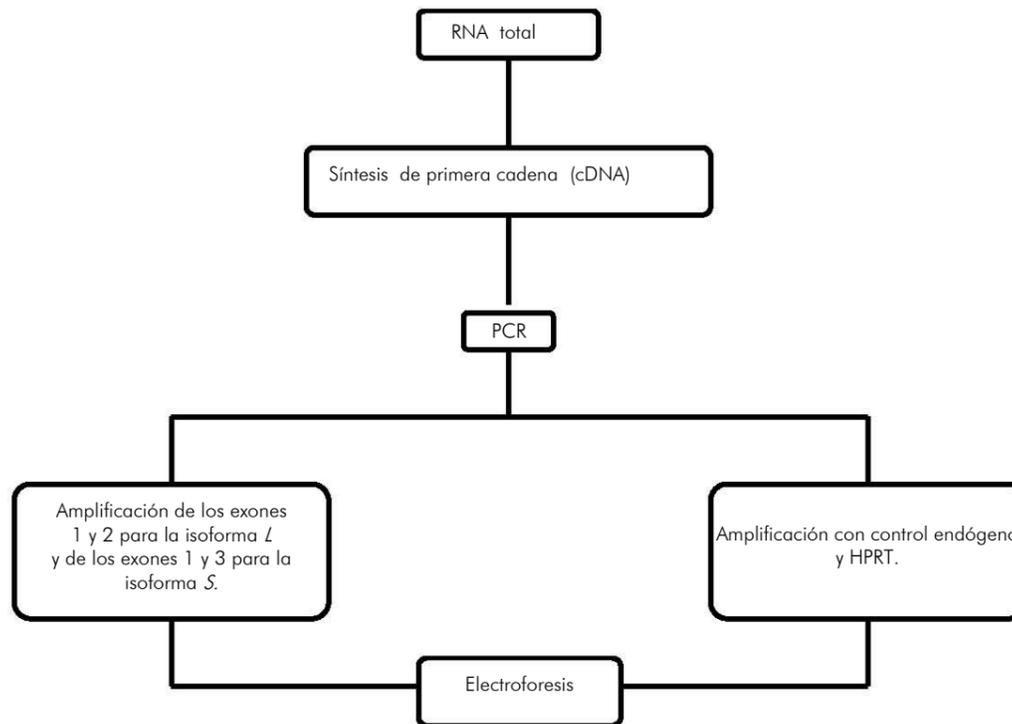


Fig. No. 15. Diagrama de flujo que muestra el procedimiento a seguir para la determinación de la expresión de las isoformas L y S del gen Mcl-1.

Reacción de síntesis de primera cadena

La reacción de síntesis de primera cadena se realizó bajo las condiciones que indica el kit comercial Thermo Script™ RT-PCR System, en tubos Eppendorf de 0.5 mL:

Tubo de reacción:

Oligo (dT) ₂₀	50 U/ μL	1 μL
RNA total	3 μg/μL	χ μL
dNTP's mix	10 mM	2 μL
H ₂ O DEPC		χ μL
Volumen final		12 μL

- Se incubó a 65 °C por 5 minutos en un termociclador a fin de desnaturalizar el RNA y el oligonucleótido.

Master Mix:	
Buffer 5X	4 μ L
DTT 0.1 mM	1 μ L
Inhibidor RNasa 40 U/ μ L	1 μ L
Thermo Script 15 U/ μ L	1 μ L
H ₂ O DEPC	1 μ L
Volumen final	8 μ L

- A cada tubo de reacción se agregaron 8 μ L de master mix para obtener un volumen final de reacción de 20 μ L.
- Se transfirió a un termociclador precalentado a 50 °C y se incubó por 60 min.
- La reacción se finalizó incubando la muestra a 85 °C por 5 minutos
- El producto se almacenó a -20 °C.

Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo según las siguientes condiciones:

Master Mix:	
Buffer 10X	1 μ L
MgCl ₂ 50mM	0.3 μ L
dNTP's mix 10 mM	0.2 μ L
Taq Platinum 5 U/ μ L	0.3 μ L

Tubo de reacción:			
Master Mix	1.8 μ L		1.8 μ L
cDNA	1 μ L		1 μ L
Iniciadores 20 μ M			
F	1 μ L	F	2 μ L
LR	1 μ L	CI	1 μ L
F	1 μ L		
SR	1 μ L		
H ₂ O DEPC	5.2 μ L		4.2 μ L
Volumen final	10 μ L		10 μ L

- La muestra se amplificó en un termociclador con un ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, desnaturalizando a 94 °C durante 30 segundos, la amplificación se ajustó a la T_m de los iniciadores a 65 °C por 30 segundos y la extensión se realizó a 74 °C por 30 segundos.

- El producto se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Electroforesis

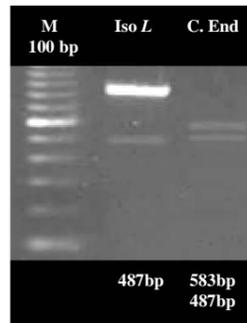
Se analizaron $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada producto obtenido de la reacción de PCR junto con $1\text{ }\mu\text{L}$ de colorante (azul de bromofenilo [6X]) en geles de agarosa al 1.5% (0.45 g de agarosa, 50 mL de TAE y $0.4\text{ }\mu\text{L}$ de bromuro de etidio [$1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$]). El tamaño de los amplificados se comparó con marcadores de 100 y 123 bp.

La electroforesis se completó tras 40 minutos a 70 Volts.

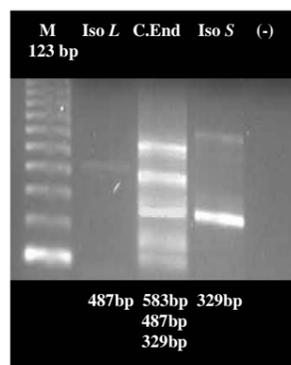
RESULTADOS

Las siguientes fotografías ejemplifican la expresión de los transcritos. Para su fácil comprensión, la Tablas No. 8, No. 9 y No. 10 se han dividido en tres grupos según la presencia o ausencia de las isoformas:

- Las muestras uno a la seis, expresaron únicamente el transcrito correspondiente a la isoforma antiapoptótica identificada como "L". (Gpo. 1)

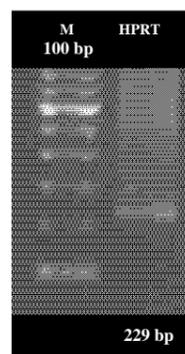


- Las muestras siete, ocho, nueve y diez expresaron además de la isoforma anterior, la variante "S" o proapoptótica. (Gpo. 2)



En los casos en los que se expresaron ambas isoformas, la variante proapoptótica se caracterizó por ser un producto que constantemente apareció menos teñido que el correspondiente a la isoforma antiapoptítica, lo que sugiere que pudiera tratarse de un transcrito de menor abundancia. Un caso muy similar a Bcl-x_S, que es menos abundante que su variante Bcl-x_L.

- Las dos muestras restantes, correspondientes a tumores filoides, se excluyeron del Gpo. 1, a pesar de que el patrón de expresión es el mismo, sin embargo se consideran semejantes a un caso normal, debido a que un tumor filoides es un tumor benigno de la mama. (Gpo. 3)
- Todas las muestras amplificaron HPRT, para corroborar la presencia de RNA total.



En las siguientes tablas se muestran los datos y los resultados obtenidos para las 12 pacientes que se incluyeron en este estudio.

La Tabla No. 8, hace referencia a la edad, estadio del tumor y diagnóstico patológico

La Tabla No. 9, muestra la concentración del RNA total. Dichas cantidades se ajustaron para utilizar 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la reacción de síntesis de primera cadena.

Tabla No. 8. Edad, clasificación TNM y diagnóstico patológico de las pacientes.

Muestra No.	No. Control	Edad (años)	Clasificación T N M	Diagnóstico Patológico
1	125	60	T ₂ N ₀ M _x Bil	Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Necrosis tumoral tipo comedo e inflamación crónica leve. Mx(-).
2	173	51	T ₂ N ₀ M _x	Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática y vascular. Necrosis tumoral 20% e inflamación + + +. Mx(-).
3	13C	63	T _{3b}	Mama izquierda Metástasis ganglionar M1.
4	14C	68	T _{3b}	Mama izquierda Carcinoma canalicular infiltrante.
5	15C	69	T _{3b}	Mama izquierda Metástasis ganglionar M1.
6	146	57	T ₄ N ₂ M _x	Adenocarcinoma pobremente diferenciado Mx(-) compatible con carcinoma de conductos mamarios.
7	107	44	T ₃ N ₂ M _x	Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Necrosis focal + tumores en bordes quirúrgicos e inflamación crónica. Mx(-).
8	86	50	T ₃ N ₁ M _x	Necrosis tumoral tipo comedo 5% Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Mx(+) en ganglios.
9	177	44	T ₃ N ₂ M _x	Carcinoma de conductos infiltrantes con extensa angioinvasión linfática y vascular e inflamación + + +. Mx(-).
10	136			Carcinoma Ductal
11	Fil 1	----	Filoides	-----
12	Fil 2	----	Filoides	-----

La muestra sombreada en la Tabla No. 8 carece de datos importantes como la clasificación TNM, así como de un diagnóstico patológico bien definido, sólo se conoce el diagnóstico diferencial ya que a la paciente no se le dio seguimiento por deserción. Sin embargo, se incluyó en el estudio ya que los resultados obtenidos, presentan un patrón muy similar al de otras muestras de adenocarcinomas mamarios.

Tabla No. 9. Concentración del RNA total en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a una absorbancia de 260 nm.

Muestra No.	No. Control	RNA total [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
1	125	1476 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	173	1848 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	13C	1822 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	14C	1047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	15C	743 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
6	146	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
7	107	1698 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
8	86	2848 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
9	177	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
10	136	1358 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
11	Fil 1	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
12	Fil 2	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$

La Tabla No. 10 resume los resultados obtenidos para la expresión de los transcritos de las isoformas antiapoptótica y proapoptótica del gen Mcl-1, además del uso del gen HPRT como control.

Tabla No. 10.. Expresión de los transcritos de las isoformas "L" y "S" del gen Mcl-1.

Muestra No.	No. Control	Mcl-1 "L"	Mcl-1 "S"	HPRT
1	125	✓	X	✓
2	173	✓	X	✓
3	13C	✓	X	✓
4	14C	✓	X	✓
5	15C	✓	X	✓
6	146	✓	X	✓
7	107	✓	✓	✓
8	86	✓	✓	✓
9	177	✓	✓	✓
10	136	✓	✓	✓
11	Fil 1	✓	X	✓
12	Fil 2	✓	X	✓

DISCUSION

Mcl-1, como miembro de la familia antiapoptotica Bcl-2, juega un papel importante dentro del proceso de muerte celular.

Los resultados anteriores, muestran que la participación de Mcl-1 es mayoritariamente antiapoptotica, puesto que la isoforma L se expresó en todas las muestras sometidas a estudio; sin embargo la variante encargada de promover la muerte celular se detectó en cuatro ellas.

Mcl-1 codifica dos proteínas distintas, una de ellas suprime la apoptosis, mientras que la otra es capaz de promover la muerte celular. En diversos estudios, donde se ha trabajado con líneas celulares de placenta humana o de leucemia mieloides, se reporta la existencia de ambas variantes.

A nivel de mRNA, la diferencia entre estas isoformas radica en la ausencia de 248 nucleótidos cerca del extremo 3' para la variante proapoptótica, originado por el empalme alternativo que ocurre en el exón 2. La secuencia de las dos variantes ha sido comparada previamente por Bae J. et al.⁵⁸ y se confirma que existe un cambio en el marco de lectura ubicado después del dominio BH3. Como consecuencia, la proteína que promueve la muerte celular, carece de los dominios BH1, BH2 y TM. (Fig. No. 16)

Mcl-1L	MFGLKRNAVIGLNLYCGGAGLGAGSGGATRPGGRLLATEKEASARREIGG	50
Mcl-1S	MFGLKRNAVIGLNLYCGGAGLGAGSGGATRPGGRLLATEKEASARREIGG	
Mcl-1L	GEAGAVIGGSAGASPPSTLTPDSRRVARPPPIGAIEVPDVTATPARLLFFAPT	102
Mcl-1S	GEAGAVIGGSAGASPPSTLTPDSRRVARPPPIGAIEVPDVTATPARLLFFAPT	
Mcl-1L	RRAAPLEEMEAPAADAIMSPEEELDGYEPEPLGKRPAVLPLELVGESGNN	153
Mcl-1S	RRAAPLEEMEAPAADAIMSPEEELDGYEPEPLGKRPAVLPLELVGESGNN	
Mcl-1L	TSTDGSLPSTPPAEIEEDELRYQSLEIISRYLREQATGAKDTKPMGRSGAT	205
Mcl-1S	TSTDGSLPSTPPAEIEEDELRYQSLEIISRYLREQATGAKDTKPMGRSGAT	
	BH3	
Mcl-1L	SRKALET LRRVGDGVQ RNHETAFQG MLRKLDIKNEDDVKLSRVMIHVFS	255
Mcl-1S	SRKALET LRRVGDGVQ RNHETAFQG WVGVLPCRGPRRWHQECAAGFC	253
	BH1	
Mcl-1L	DGVTNWGRIV TLISFGAFVAKHLKTIHQESCIEPLAESITDVLV RTKRD WL	306
Mcl-1S	RCCWRSWFG ISNKIAL*	271
	BH2 TM	
Mcl-1L	VKQRGWDGF VEFFHVEDLEGGIR NLLAFAGVAGVAGLA YLIR*	350

Fig. No. 16. Comparación de las secuencias de aminoácidos entre las dos proteínas.; Mcl-1 L y Mcl-1-S. Los residuos proteicos idénticos entre ambas proteínas se muestra sombreado, el marco abierto de lectura para Mcl-1 S predice una proteína de 271 aminoácidos, mientras que para Mcl-1 L se espera un producto de 350 aminoácidos. Los dominios BH1, BH2 y TM no se observan en Mcl-1 S.⁵⁸

Las muestras del grupo uno, corresponden a tumores en estadio dos, tres y cuatro cuyo diagnóstico patológico refiere la presencia de carcinomas de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática y vascular, así mismo se reporta necrosis e inflamación crónica además de metástasis ganglionar en dos de ellas.

La expresión del transcrito para la isoforma "L" o antiapoptótica en este tipo de muestras es de esperarse ya que se trata de células que han perdido la inducción a la muerte celular; además de que Mcl-1 se expresa en células de constante proliferación.

A pesar de tratarse de tumores en estadio dos, un tumor que podría considerarse poco agresivo, el diagnóstico patológico indica angioinvasión linfática; es decir, posible diseminación a los ganglios más cercanos.

En base a la estructura de la isoforma L, podemos observar que posee dominios importantes que resaltan su función supresora de la muerte celular al formar horquillas hidrofóbicas: los dominios BH1, BH2 y BH3. Estos dominios se han caracterizado también en otros miembros de la familia Bcl-2. (Fig. No. 17)

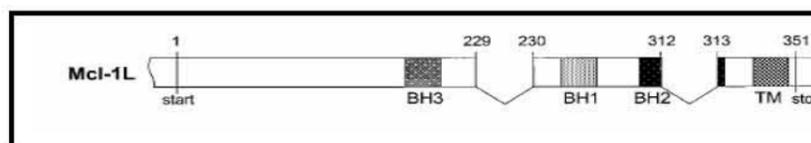


Fig. No. 17. Estructura de la isoforma L del gen *mcl-1*. Se muestran los intrones (v) y el codón de inicio (1).⁵⁸

La ausencia de la isoforma proapoptótica en estas muestras pudo deberse a la total supresión de su función por la variante antiapoptótica.

La región que rodea a los dominios BH1 y BH2 es importante para la heterodimerización con otros miembros de la familia Bcl-2, mientras que la región TM es vital para el anclaje de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 a la mitocondria y a otros organelos celulares.

Muchos miembros de la familia Bcl-2 que solo poseen el dominio BH3 se han caracterizado como ligandos proapoptóticos capaces de suprimir la función de unión a otros miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2 después de la formación de heterodímeros.

Ya que Mcl-1S carece de los dominios BH1 y BH2, pero posee aún el dominio BH3 se le han atribuido funciones netamente proapoptóticas, lo que se comprobó en estudios donde se transfectó un plásmido con exceso de Mcl-1S, resultando en muerte celular. (Fig. No. 18)

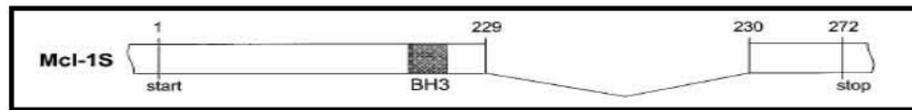


Fig. No. 18. Estructura de la isoforma S del gen *mcl-1*. Se muestra el intrón (v) y el codón de inicio. (1).⁵⁸

Sin embargo, el efecto proapoptótico de Mcl-1S puede ser bloqueado por inhibidores de las caspasas, tales como P53 durante la cascada de muerte celular.

Ambas isoformas coexisten en las células sanas viables al mismo tiempo, manteniendo la homeostasis en el tejido epitelial, siendo Mcl-1L más abundante que su variante con funciones opuestas.

Al tratarse de transcritos extremadamente inducibles, un mínimo aumento en la expresión de uno de los ellos sugiere un balance inapropiado entre ambas isoformas, lo que daría un efecto antagónico de uno sobre el otro.

A nivel de proteínas, la acción de la variante que promueve la muerte celular queda completamente inhibida por la isoforma antiapoptótica. Este efecto fue demostrado al transfectar plásmidos que codificaban para Mcl-1L donde la inhibición se presentó en un rango de 3:1.

En contraste a la heterodimerización de las isoformas que da como resultado el total efecto inhibidor de Mcl-1L sobre Mcl-1S, se afirma que esto no ocurre con otros miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bcl-xL y Bcl-w, quienes al interactuar con Mcl-1S hacen que la acción proapoptótica de esta isoforma solo sea parcialmente bloqueada.⁵⁸

Así mismo Mcl-1L no es capaz de antagonizar la acción de otros miembros proapoptóticos, aún cuando se haya incrementado el nivel del plásmido transfectado.

La formación de dímeros de ambas isoformas o con miembros de la misma familia se resume como se indica a continuación:

Tabla No 11. Formación de dímeros para las isoformas L y S del gen Mcl-1.

Unión	Formación de dímero	Efecto
Mcl-1 L + Mcl-1 S	✓	Bloqueo total de la acción proapoptótica de Mcl-1 S
Mcl-1 L + Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2	✓	Bloqueo mínimo de la acción proapoptótica
Mcl-1 L + Miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2	X	Ausencia de interacción
Mcl-1 S + Mcl-1 L	✓	Bloqueo total de la acción proapoptótica de Mcl-1 S
Mcl-1 S + Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2	X	Ausencia de interacción
Mcl-1 S + Miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2	X	Ausencia de interacción

Por tanto, los resultados en base a la expresión del transcrito que codificará para la proteína antiapoptótica en estas muestras de adenocarcinomas mamarios son sólo de carácter confirmativo.

La célula tumoral seguirá proliferando indefinidamente sin que exista la posibilidad de frenar su crecimiento por sí misma ya que aún ante la formación de dímeros con otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, existirá un bloqueo parcial de su función y la célula optará por la sobrevivencia celular.

Respecto a las muestras que corresponden al grupo 2, en donde ambas isoformas fueron detectadas, se descarta también la formación de dímeros con miembros proapoptóticos que pudieran resaltar su función como promotora de la muerte celular.

En este caso se propone que el empalme alternativo de Mcl-1S pudiera utilizar el mismo mecanismo de transcripción que para Mcl-1L lo que conllevaría a la disminución de su expresión a nivel del transcrito.

Mcl-1S interactúa únicamente con su variante Mcl-1L lo que sugiere que el mecanismo de empalme alternativo en una célula que exprese Mcl-1L pudiera ser regulado bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. De esta manera, resultaría la síntesis de la proteína proapoptótica Mcl-1S capaz de inducir la muerte celular.

En estas muestras, a pesar de que ambos transcritos se encuentran expresados, la isoforma antiapoptótica se encuentra en mayor abundancia. Su variante con función opuesta puede regularse de manera postranscripcional por medio de interacciones proteína-proteína, lo que la dejaría inhabilitada para iniciar el proceso de muerte celular.

Si la proteína sufriera fosforilación, quedaría impedida para asociarse con Mcl-1L, sin embargo ante la presencia de estímulos apoptóticos su interacción con la proteína causante de la fosforilación no existiría y Mcl-1S podría unirse a otras proteínas antiapoptóticas que no sean miembros de Bcl-2 o bien a Mcl-1L y promovería la muerte celular.

De igual manera, Mcl-1S podría ser secuestrada en el citosol como proteína inactiva y sufriría hidrólisis por las caspasas, específicamente por la caspasa 8 para dar de nuevo origen a dos fragmentos distintos.

Uno de estos fragmentos volvería a situarse en la mitocondria donde actuará antagonizando a las proteínas antiapoptóticas.

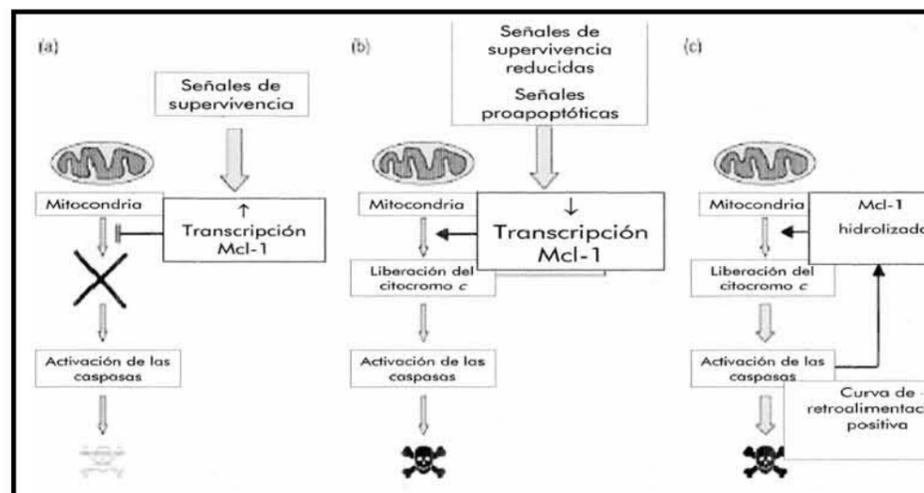


Fig. No. 19. Regulación de la apoptosis por Mcl-1. a) La inducción en la expresión de Mcl-1 por medio de factores de supervivencia puede contribuir a la resistencia hacia la apoptosis. b) La privación de los factores de supervivencia o de la exposición a señales proapoptóticas conlleva a la apoptosis al libere el citocromo c de la mitocondria. c) La activación de las caspasas durante la apoptosis puede hidrolizar restos de Mcl-1; en cualquiera de sus 2 variantes, generando una molécula altamente promotora de la muerte celular.⁵³

Gracias a la presencia de estímulos proapoptóticos, la proteína es liberada y actúa como inductora de muerte celular.

Inducir a la muerte a las células tumorales es una nueva y atractiva estrategia en la terapia contra el cáncer, posible gracias a los avances en el entendimiento de los mecanismos de la apoptosis.⁶³

Actualmente, se reportan trabajos en líneas celulares y en modelos animales en los que se han desarrollado exitosamente compuestos que se unen a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 con afinidades sub-nanomolares y que poseen una potente actividad anti tumoral.⁴⁵

La finalidad en este tipo de estrategias es, entre otras, estimular mecanismos que disparen selectivamente la apoptosis celular, estén o no relacionados con la activación de caspasas, así como inhibir o retirar los factores de crecimiento. (Tabla No.12)

Tabla No. 12. Apoptosis en cáncer.

Cáncer	
Situación Patológica:	
Apoptosis	↓ (anti apoptosis)
Factores tróficos	↑↓
Actividad caspasas	↓
Bcl-2	↑
Tratamiento:	
Factores de crecimiento	Inhibir
Caspasas	Estimular
Cinasas	Variable
Apoptosis	Estimular (pro apoptosis)
↑: Aumento de actividad ↓: Disminución de actividad	

La dificultad para inducir una apoptosis selectiva en células tumorales se considera una de las causas del fracaso terapéutico en el tratamiento de muchas enfermedades neoplásicas en la actualidad. Por ello, se torna de fundamental importancia el llegar a conocer las vías mediadoras en la apoptosis celular, con el fin de inducirla o inhibirla.

Este enfoque puede posteriormente ayudar a reconocer las dianas y mecanismos de posible explotación terapéutica. Así, es un hecho reconocido que diversos productos capaces de inducir apoptosis en células cancerosas de diversas estirpes, ejercen su efecto terapéutico y apoptótico a través de la inhibición de mecanismos de membrana que consecuentemente a ello, producen una acidificación intracelular. El alcanzar una cierta disminución del pHi parece ser un factor esencial en permitir la iniciación de una reacción en cadena que acaba en la apoptosis.

CONCLUSIONES

- Mcl-1 L se pudo identificar en las 12 muestras de adenocarcinomas mamarios, lo que sugiere que el proceso de muerte celular está disminuido. Esto se observa con frecuencia en patologías en las que existe una proliferación celular descontrolada, como en el cáncer.
- La variante proapoptótica, Mcl-1 S se identificó en 4 de un total de 12 muestras.
- Mcl1- S coexistía con la isoforma antiapoptótica, siendo minoritaria en relación a Mcl1- L .
- La coexistencia de ambas isoformas sugiere la formación de dímeros entre ellas mismas o bien con otros miembros de la familia Bcl-2.
- No se confirmó la hipótesis de que la variante antiapoptótica sea más dominante en etapas avanzadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Thompson, Thompson. *Genética en Medicina* . 6a. edición. Ed. Macusso, 2005. pp 329:335
- 2.- Li Y. Carcinoembryonic antigen as a monitor of recurrent breast cancer. *J. Surg Oncol.* 1982;20:109.
- 3.- Thompson, Thompson. *Genética en Medicina* . 4a. edición. Ed. Macusso, 2005. pp 362:363.
- 4.- Parker S, Tong T, Bolden S, et al. Cancer statistics. 1996. *CA* 1996; 46-5.
- 5.- Hankey B, Brinton L, Kessler L, et al. In: Miller B, Ries L, Hankey B, et al, eds. *SEER Cancer Statistics Review 1973-1990*. National Institutes Of Health Publication 93-2789. Bethesda: National Institutes Of Health. 1993.
- 6.- Harris J, Lippman M, Morrow M, et al. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- 7.-Madigan M, Ziegler R, Benichou C, et al. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well established risk factors. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1681.
- 8.-Broca P. *Tratado de tumores*. Paris: Asselin, 1866.
- 9.- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA-1. *Science* 1994;266:66.
- 10.- Claus E, Risch N, Thompson W. Genetic analysis of breast cancer in the Cancer and Steroid Hormone study. *Am J Hum Genet* 1991;48:232.
- 11.- Easton D, Bishop D, Ford D, et al. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancers: Results from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993;52:678.
- 12.- Shattuck-Eidens D, McCloure M, Simard J, et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA-1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA* 1995;273:535.
- 13.- Chen Y, Chen C, Riley D, et al. Aberrant subcellular localization of BRCA-1 in breast cancer. *Science* 1995;270:289.
- 14.- Malkin D, Li F, Strong L, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasm. *Science* 1990;250:1233.
- 15.- Ekblom A, Trichopoulos D, Adami H, et al. Evidence of prenatal influence on breast cancer risk. *Lancet* 1995;340:1015.

- 16.- MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. J Natl Cancer Inst. 1973;50:21.
- 17.- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. J Natl Cancer Inst. 1972;48:605.
- 18.- MacMahon B, Cole P, Lin T. Age at first birth and breast cancer risk. Bull WHO 1970;43:209.
- 19.- Steinberg K, Thacker S, Smith S, et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. JAMA 1991;265:1985.
- 20.- Wolff M, Toniolo P, Lee E, et al. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1993;85:648.
- 21.- Kessler L, Feur E, Brown M. Projections of the breast cancer burden to US women. 1990-2000. Prev Med 1991;20:170.
- 22.- van der Vijver M, Peterse J, Mooi W, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer: association with comedo-type ductal carcinoma *in situ* and limited prognostic value in Stage II breast cancer. N Engl J Med. 1988;319:1239.
- 23.- Lagios M, Margolin F, Westdahl P, et al. Mammographically detected duct carcinoma *in situ*: frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. Cancer 1989;63:618.
- 24.- Meyer J. Cell kinetics of histologic variants of *in situ* breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat 1986;7:171.
- 25.- Ramachandra S, Machin L, Ashley S. et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 *in situ* breast carcinoma: a detailed morphological analysis J. Pathol 1990;161:7.
- 26.- Haagensen C, Bodian C, Haagensen D. Lobular neoplasia (lobular carcinoma *in situ*) breast carcinoma: risk and detection. Philadelphia: Wb Saunders, 1981:238.
- 27.- Page D, Kidd TJ, Dupont W, et al. Lobular neoplasia of the breast: Higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. J Clin Pathol 1991;22:1232.
- 28.- Lemanne D, Simon M, Martino S, et al. Breast carcinoma *in situ* (CIS): Greater rise in ductal carcinoma *in situ* (DCIS) versus lobular carcinoma *in situ* (LCIS). Proc ASCO 1991;10:45.
- 29.- Andersen J. Lobular carcinoma *in situ* of the breast: An approach to rational treatment. Cancer 1977;39:2797.

- 30.- Carson W, Sanchez-Forgach E, Stomper P, et al. Lobular carcinoma *in situ*: Observation without surgery as an appropriate therapy. *Ann Surg Oncol* 1994;1:14131.- Walt A, Simon M, Swanson G. The continuing dilemma of lobular carcinoma *in situ*. *Arch Surg* 1992;127:904.
32. American Joint Committee On Cancer. Manual for Staging of Cancer. In:BAHRS O:Hensend Hutter R, et al. Eds. Manual for staging of cancer. Philadelphia: J B Lippincott, 1992-149.
- 33.-González F. Una nueva modificación en la clasificación TNM en el cáncer mamario. *Rev. Esp. Patol.* 2004;247:251.
- 34.-Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;238:257.
- 35.- Yuang J. Shaham S. Ledoux S. Ellis HM, Horvitz. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin- 1 β converting enzyme. *Cell.* 1993;641:652.
- 36.- Elinos C, Maldonado V, Meléndez J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac. Med. Méx.* 2003;493:499.
- 37.- White E. Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes and development.* 2277:2284.
- 38.- Gómez E, Zentella A. Apoptosis y muerte celular programada. *BEB.* 105:114.
- 39.- Cohen GM Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;1:16.
- 40.-Ventura JL, Gómez E, Zentella A, Caspasas: Una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis *BEB J8(4):153-165* .
- 41.-Tan X, Wang J. The caspase RB connection in cell death. *Trends Cell Biol* 1998;116:120.
- 42.- Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL, Eisenberg RA. Bcl-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol* 1995;5455:62.
- 43.- Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R, Alderson MR. Selective activation induced apoptosis of periferal T cells imposed by macrophages. *J. Immunol.* 1995;515:22.
- 44.- Binder C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathogenical variables. *Annals of Oncology* 1995;1005:10.

- 45.- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;609:19.
- 46.-Osborne BA, Schwartz LM. Essential gens that regulate apoptosis. *Trends in Cell Biol.* 1994;394:99.
- 47.-Boise LH, González-García M, Postema CE. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;597:08.
- 48.-Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;107:21.
- 49.-Núñez G, Merino R, Grillot D, Gonzales-García M. Bcl-2 and Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today* 1994;582:88.
- 50.-Núñez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death and survival. *Trends in Cell Biol* 1994;399:03.
- 51.- Cory S. Regulation of lymphocyte survived by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev, Immunol* 1995;513:43.
- 52.- Ashwell JD, Berger NA, Cidlowski JA, Jane DP, Korsweyer SJ. Coming to terms with death: Apoptosis in cancer and inmune development. *Today* 1994;147:51.
- 53.- Michels J, Johnson P, Packham G. Molecules in focus. Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;267:271.
- 54.- Kozopas, K. M. et al. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 1993;3516:3520.
- 55.- Craig, R. W. MCL-1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*, 2002;444:454.
- 56.- Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*. 1998; 1322:1326.
- 57.- Krajewski, S. et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *American Journal of Pathology*, 1995;1309:1319.

- 58.- Jeehyeon B, Chandra P. ‡, Sheau Y, and Aaron J. MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *The journal of biological chemistry*. 2000; 275:25255-25261.
- 59.- Michels J, et al. (in press). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*.
- 60.- Tao Y, Kozopas K, and Craig R. The Intracellular Distribution and Pattern of Expression of Mcl-1 Overlap with, but Are Not Identical to, Those of Bcl-2 *The Journal of Cell Biology*. 1995; 131:1173-1184.
- 61.- García N, Salamanca F, Astudillo H, Curiel E, Alvarado I, Grados G, Arenas D. A molecular analysis by gene expression profiling reveals *bik/nbk* over expression in sporadic breast tumors of Mexican females sample. *BMC Cancer* 2005
- 62.- www.ncbi.nih.gov
- 63.- Wagner G, Ending the prolonged life of cancer cells. *Nature chemical biology*. 2005;8:9.

GLOSARIO

A

Alelo. Una de las versiones alternativas de un gen que ocupa un locus determinado de un cromosoma.

Alelo mutante. Alelo que se crea cuando una parte de un cromosoma se replica de forma errónea durante la meiosis.

Amplificación génica. Es un aumento en el número de copias de un fragmento de DNA particular; es un proceso raro o inexistente en las células normales pero que resulta en ocasiones frecuente en células cancerosas.

Aneuploidía. Término que hace referencia a cambios en el número de cromosomas, pueden dar lugar a enfermedades genéticas y se presenta como resultado de una no separación cromosómica o por rezago anafásico de un cromosoma durante la división celular.

Ataxia telangiectasia. El término ataxia se refiere a movimientos descoordinados, y telangiectasia al agrandamiento de los vasos sanguíneos (capilares) justo por debajo de la superficie de la piel. Los defectos en este gen pueden llevar a que se presente muerte celular anormal en diversos lugares del cuerpo, incluyendo la parte del cerebro que ayuda a coordinar el movimiento.

Autosoma. Cromosoma no usado para la determinación del sexo. El genoma humano está formado por 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. La herencia de una enfermedad, afección o rasgo específico depende del tipo de cromosoma afectado (autosómico o cromosoma sexual) y de si el rasgo es dominante o recesivo.

Autosómico dominante. La herencia de carácter autosómico dominante significa que el gen está ubicado en uno de los autosomas afectando a hombres y mujeres por igual, y sólo se necesita un gen para tener esta característica.

Autosómico recesivo. La herencia recesiva significa que ambos genes de un par deben estar defectuosos para causar la enfermedad.

B

bcl-2. Gen cuyo nombre deriva de *B-cell lymphoma 2*, linfoma de células B-2; segundo miembro de un grupo de proteínas inicialmente descrito en estudios de la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 observada en linfomas foliculares.

Bcl-2^{}**. Es una familia de proteínas formada por 25 miembros aproximadamente que constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular.

brca-1. Gen que se localiza en el cromosoma 17. Las mutaciones en el gen se transmiten con un patrón autosómico dominante.

*De acuerdo a las normas internacionales de nomenclatura los genes se escriben con minúscula en letra cursiva (*bcl-2*, *brca-1*)

**Las proteínas codificadas por estos genes se escriben con un tipo regular y comienzan con mayúsculas (Bcl-2)

brca-2. Gen que se localiza en el cromosoma 13. Las mutaciones en el gen se transmiten también con un patrón autosómico dominante. Tanto el *brca1* como el *brca2* son genes supresores tumorales que comúnmente tienen la función de controlar el crecimiento celular y la muerte celular.

C

cDNA. DNA fabricado usando RNA complementario. En su forma de una sola cadena el cDNA es usado con frecuencia como una sonda.

Célula somática. Cualquiera de las células del cuerpo excepto las reproductivas.

D

Diminutos dobles. Son pequeños fragmentos extracromosómicos de tamaño variable que se replican automáticamente.

DNA. Acido desoxirribonucleico; el material genético de los seres vivos, existe en las células como una doble hélice.

Dominante. Un alelo cuyo efecto es el mismo en las condiciones de heterocigoto y homocigoto.

E

Electroforesis. Método para separar moléculas, mismas que se mueven a lo largo de una corriente eléctrica en un medio (frecuentemente un gel) a diferentes velocidades, dependiendo de su carga y tamaño.

Enzima de restricción. Enzima aislado de las bacterias que reconoce secuencias específicas de nucleótidos de DNA y corta el DNA en ese sitio.

Estimulación autócrina. Ocurre cuando una célula que produce determinado factor de crecimiento expresa el mismo tiempo el receptor para dicho factor

Exón. Región transcrita de un gen que está presente en el mRNA maduro y que posee el código para la síntesis de una proteína.

F

Fenotipo. Expresión física del genotipo de un individuo.

Formas mendelianas de cáncer. Trastornos como el retinoblastoma en los que el riesgo de cáncer es muy alto, en algunos casos cercano al 100% y en el que pueden existir múltiples tumores primarios.

G

Gen. En términos moleculares, secuencia de DNA cromosómico que se requiere para producir un producto funcional o proteína.

Gen supresor de tumor. Gen normal implicado en la regulación de la proliferación celular. Ciertas mutaciones recesivas pueden desencadenar el desarrollo de tumores, como el gen *p53*.

Genotipo. Establece toda la información almacenada en el DNA, es decir, los millones de pares de bases que forman los genes.

H

Hiperplasia atípica. Consiste en un cambio en las células que sólo se observa bajo el microscopio y que se encuentra después de practicar una biopsia de mama. Las mujeres que presentan hiperplasia atípica y antecedentes familiares de cáncer de mama en la madre, una hermana o una hija corren un riesgo más elevado.

Heterocigoto. Tener dos alelos diferentes en el mismo locus en un par de cromosomas homólogos.

Homocigoto. Tener dos alelos idénticos en el mismo locus en un par de cromosomas homólogos.

Homólogos. Los pares de cromosomas que portan los genes para las mismas características en el mismo sitio de cada cromosoma.

hprt*. (*Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa*) Gen de la economía doméstica situado en la región q26-27 del cromosoma X, es utilizado como control en las reacciones de PCR.

I

Intrón. Segmento de un gen que es inicialmente transcrito, pero que después es eliminado de la transcripción primaria del RNA al empalmarse las secuencias existentes a cada lado (exones).

L

Línea celular. Células de un tipo único (humano) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.

Locus. Posición ocupada por un gen en un cromosoma. El locus (plural; loci) puede estar ocupado por diferentes formas del gen (alelos).

M

Marco de lectura. Una de las tres posibles formas de leer una secuencia de nucleótidos como series de tripletes. Un marco abierto de lectura no contiene codones de terminación y por tanto, es potencialmente traducible a proteína.

mcl-1*. Gen localizado en el cromosoma 1; su nombre deriva de *myeloid cell-leukaemia 1*, células de leucemia mieloide-1. Codifica para dos proteínas denominadas L y S, con funciones opuestas en el programa de muerte celular.

*De acuerdo a las normas internacionales de nomenclatura los genes se escriben con minúscula en letra cursiva (*hprt*, *mcl-1*)

**Las proteínas codificadas por estos genes se escriben con un tipo regular y comienzan con mayúsculas (Mcl-1 L, Mcl-1 S)

Mcl-1 L. Mcl-1 L (long; larga), es una proteína de 350 aminoácidos con función supresora de la muerte celular.

Mcl-1-S. Mcl-1 S (short; corta), es una proteína de 271 aminoácidos con función promotora de la muerte celular.

Metástasis. Diseminación de células malignas a otros lugares del cuerpo.

Mutación. Cualquier cambio permanente heredable en la secuencia del DNA genómico. Si ocurre en una célula sexualmente reproductiva, éste puede ser transmitido.

Mutación estructural. Aquella mutación que afecta a la estructura de los cromosomas, forma y tamaño.

Mutación puntual. Cambio de un solo par de bases nucleotídicas del DNA.

Mutación somática. Mutación en una célula somática.

N

Neoplasia. Crecimiento anormal producido por un desequilibrio entre la proliferación celular normal y el colapso celular normal. Puede ser benigno o maligno (cáncer).

Nucleótido. Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. Un ácido nucleico es un polímero de muchos nucleótidos

O

Oligonucleótido. Molécula corta de DNA generalmente de ocho a cincuenta pares de bases sintetizada para ser utilizada con sondas o en la reacción en cadena de la polimerasa.

Oncogén. Gen que se comporta de una forma dominante implicado en la ausencia de la regulación del crecimiento y proliferación celulares, responsable del desarrollo de tumores. La mutación o la sobreexpresión de los oncogenes en células somáticas puede producir transformación neoplásica.

P

p53. También llamado el "guardián del genoma", éste gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica una proteína nuclear de 53 KDa, de ahí su nombre. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Es un gen supresor tumoral que, por lo tanto, desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa. Procedimiento en el cual cantidades diminutas de DNA pueden ser copiadas millones de veces en unas pocas horas.

Plásmido. Molécula de DNA circular extracromosómico, existente en bacterias y levaduras, que se replica de manera independiente. Es utilizado como vector de segmentos de DNA clonado.

Poliposis familiar. Es un trastorno hereditario en el que se desarrollan 100 o más pólipos adenomatosos precancerosos, que tapizan el intestino grueso y el recto.

Promotor. Secuencia de DNA localizada en el extremo 5' de un gen, en la que se inicia la transcripción.

Protooncogén. Gen normal implicado en algunos aspectos de la división y la proliferación celular que puede activarse por mutación u otros mecanismos para convertirse en un oncogén.

R

Recesivo. Alelo cuyo efecto puede estar enmascarado por la presencia de un alelo dominante en el otro cromosoma homólogo.

Regiones homogéneamente teñidas. Uno de los dos tipos de cambio citogenético en los que se detectan múltiples copias de un segmento amplificados de DNA en particular, donde los cromosomas no se bandean de forma normal.

Retinoblastoma. Es un tumor maligno de la retina que generalmente afecta a niños menores de 6 años y se presenta cuando una célula de la retina en crecimiento sufre una mutación en el gen supresor de tumores *rb*.

RNA. Acido ácido. Tiene un papel activo en la síntesis proteica en tres formas: RNA mensajero, de transferencia y ribosomal.

RT-PCR. (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) La Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa, permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado.

S

Síndrome de Cowden. Es un trastorno autosómico dominante, caracterizado por la presencia de múltiples hamartomas en la piel, pecho, tiroides, tracto gastrointestinal, endometrio y cerebro, y que predispone a un mayor riesgo de tumores malignos como en el cáncer de mama.

Síndrome de Li- Fraumeni. Es una enfermedad rara autosómica dominante que afecta a pacientes jóvenes y que consiste en una predisposición a desarrollar un amplio rango de tumores.

Síndrome de Muir. Síndrome que se hereda con carácter autosómico dominante, caracterizado por la asociación de neoplasias cutáneas con diferenciación sebácea y tumores viscerales malignos, sobre todo carcinoma de colon.

Sonda. Secuencia de RNA o DNA marcada que se utiliza para detectar la presencia de una secuencia complementaria por hibridación molecular.

T

TAE. Buffer utilizado en la electroforesis; tris-acetato-EDTA.

Traducción. Síntesis de un polipéptido a partir de su plantilla de mRNA.

Transcripción. Síntesis de una molécula de RNA de cadena simple a partir de una plantilla de DNA en el núcleo celular y catalizada por RNA polimerasa.

Translocación. Así se denomina al intercambio de segmentos entre cromosomas. Puede ser recíproca o no, e implicar cromosomas homólogos o no homólogos.

Tumor de Wilms. También denominado nefroblastoma, es un tumor maligno que se origina en las células del riñón.

V

Vector. Molécula de DNA en la que se ha clonado un gen o un fragmento de DNA. Es capaz de replicarse en un huésped determinado y, por tanto, replicar el segmento de DNA clonado.

ANEXO I

ANEXO I

Tabla No.13. Modificación en la clasificación TNM en cáncer de mama

Estadio	Tis	N0	M0
0	Tis	N0	M0
I	T1*	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

* T1 incluye T1 mic (microinvasión (0,1 cm).

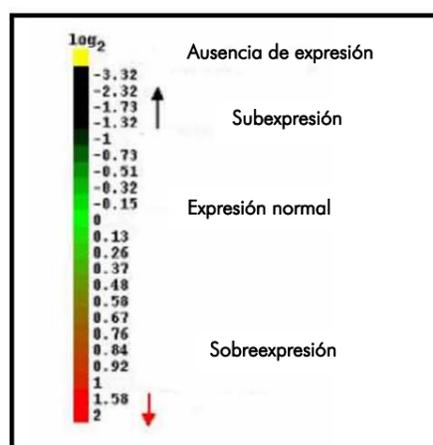
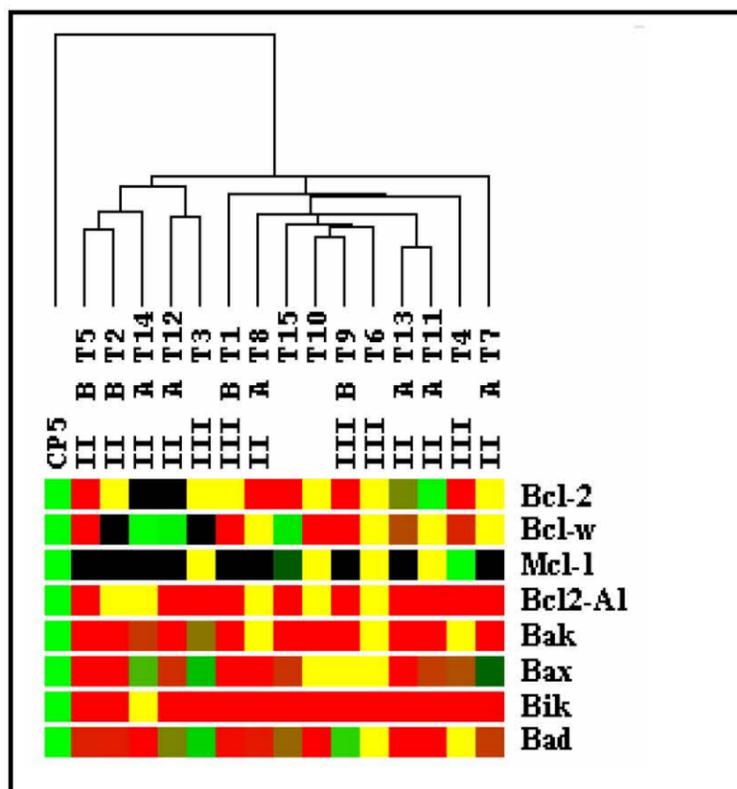
1. Se separa micrometástasis y células tumorales aisladas basándose en el tamaño y evidencia histológica de actividad maligna.
2. Se identifican el uso de la disección del ganglio centinela y de técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.
3. Las clasificaciones del estado ganglionar se realizan según el número de ganglios con metástasis. Estas se identifican con HE (preferentemente) o con inmunohistoquímica.
4. Las metástasis en ganglios infraclaviculares se clasifican como N3.
5. Se reclasifican la metástasis en los ganglios de la mamaria interna basándose en el método de su detección y en la presencia o ausencia de afectación de los axilares. La metástasis microscópica hallada con la técnica del ganglio centinela empleando linfoescintigrafía, y no por estudios de imagen o examen clínico, se clasifica como N1. Si hay afectación macroscópica de los ganglios detectada por estudios de imagen (excluyendo linfoescintigrafía) o por examen clínico, se clasifica como N2 si no hay también afectación de ganglios axilares y como N3 si hay afectación de ganglios de ambas cadenas.
6. La metástasis de ganglios supraclaviculares se clasifica como N3.

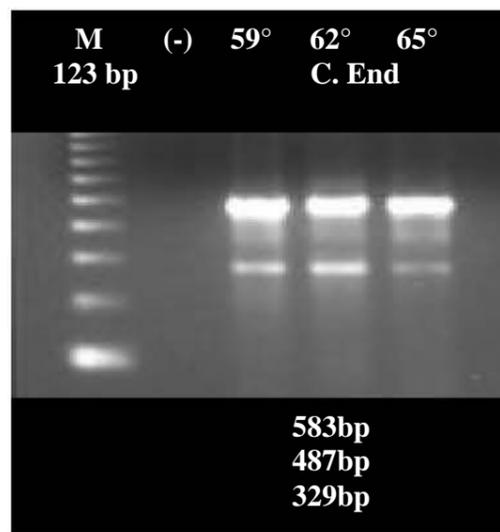
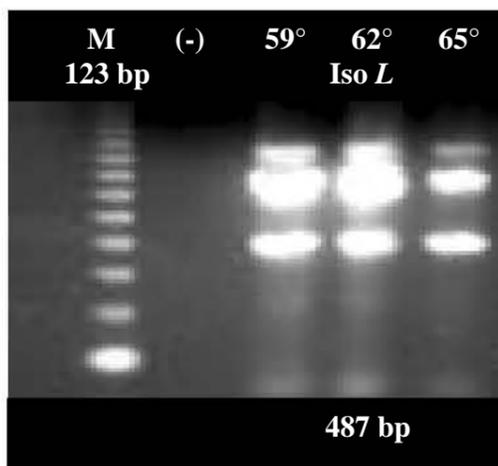
Tabla No. 14 Principales diferencias entre la clasificación TNM 5ª. Y 6ª. Edición.

5ª Edición	6ª Edición
Tis. - Carcinoma in situ	Tis. - Carcinoma in situ Tis (CDIS). - Carcinoma ductal in situ Tis (CLIS). - Carcinoma lobulillar in situ Tis (Paget). - E. de Paget del pezón sin tumor
pN0. - No ganglios regionales con metástasis	pN0. - No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales, sin examen adicional para CTA pN0(i-). - No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales, IHQ negativa pN0(i+). - No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales, IHQ positiva con CTA (grupo de células neoplásicas <0,2 mm) pN0(mol-). - No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales; estudio molecular negativo pN0(mol+). - No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales. Estudio molecular positivo
pN1. -Metást. móviles en ganglio(s) axilares ipsil.	pN1. - Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares, y/o en ganglios mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente*
pN1(mi). - Excluida	pN1(mi). - Micrometástasis (> 0,2 mm / < 0,2 cm)
pN1a. - Sólo micrometástasis (<0,2 cm)	pN1a. - Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares
pN1b. -Metástasis > de 2 mm (alguna de ellas)	pN1b. -Metástasis en ganglios mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente*
pN1bi. - Metást. 1 a 3 ganglios, >0,2 cm/<2 cm	pN1bi. - Excluida
pN1bii. - Metást. 4 ó más ganglios >0,2 cm/<2 cm	pN1bii. -Excluida
pN1biii. - Metást. < 2 cm y extensión extracapsular	pN1biii. - Excluida
pN1biv. -Metást. (2 cm	pN1biv. - Excluida
pN1c. - Excluida	pN1c. - Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares, y en ganglios mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente* (La afectación mamaria interna asociada con más de tres ganglios axilares afectados, se clasifica pN3b)
pN2. - Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales con fijación entre ellos o con otras estructuras	pN2. - Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares, o en ganglios mamaros internos clínicamente aparentes* <i>en ausencia de</i> ganglios axilares afectados
pN2a. - Excluida	pN2a. - Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral >0,2 cm)
pN2b. - Excluida	pN2b. -Metástasis en ganglios mamaros internos clínicamente detectables* <i>en ausencia de</i> ganglios axilares afectados
pN3. - Metástasis en ganglios mamaros internos	pN3. - Metástasis en 10 ó más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables* <i>en presencia de</i> 1 ó más ganglios axilares afectados; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópica en ganglios mamaros internos, clínicamente negativos, o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a. - Excluida	pN3a. - Metástasis en 10 ó más ganglios axilares (con al menos un depósito tumoral >0,2 cm), o metástasis en ganglios infraclaviculares
pN3b. - Excluida	pN3b. - Metástasis en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables* <i>en presencia de</i> 1 ó más ganglios axilares afectados; o en más de 3 ganglios axilares y en ganglios de la mamaria interna con afectación microscópica detectada con disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente
pN3c. - Excluida	pN3c. - Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
M1. - Metástasis a distancia (incluida en ganglios supraclaviculares)	M1. - Metástasis a distancia

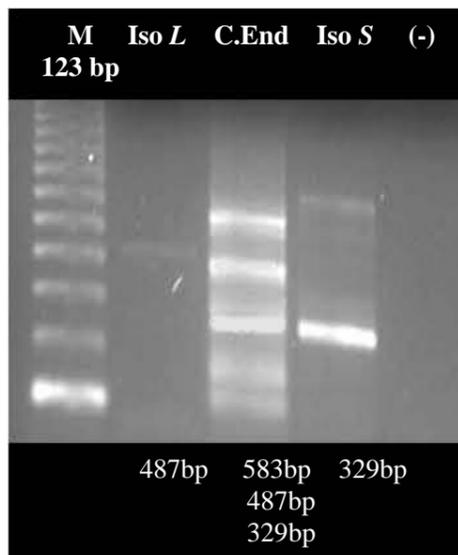
* Clínicamente aparente, detectable: Detectado por estudios de imagen (excluyendo linfoscintigrafía) o por examen clínico.

Fig. No. 20. Microarreglo de expresión en tumores mamarios de mujeres mexicanas.⁶¹

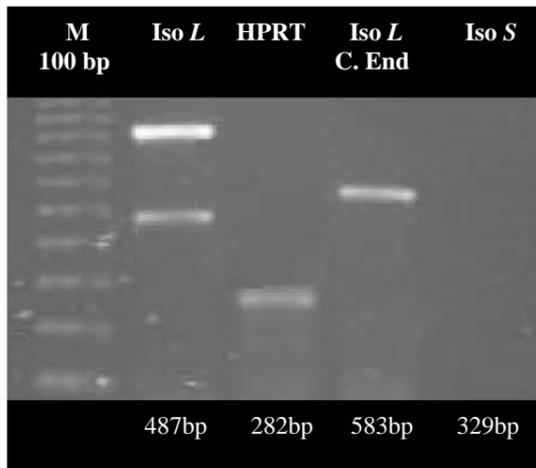




Muestra No.107. Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Necrosis focal + tumores en bordes quirúrgicos e inflamación crónica. Mx(-).



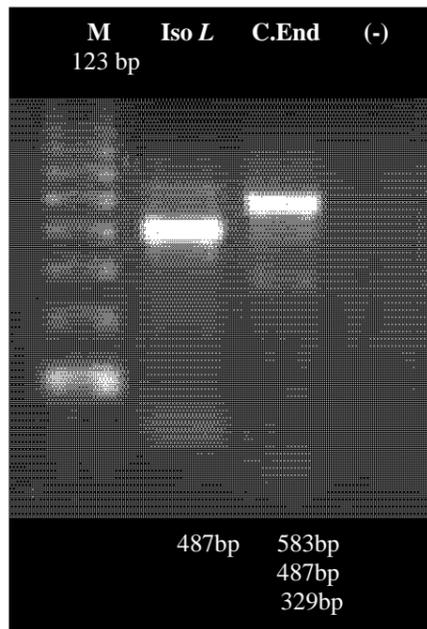
Muestra No.136 Carcinoma ductal.



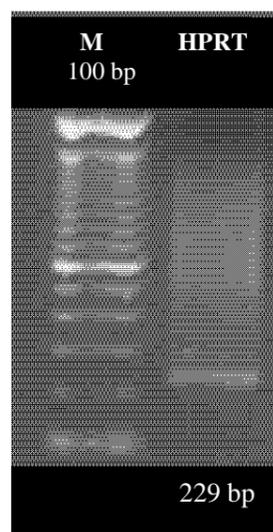
Muestra No.125 Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Necrosis tumoral tipo comedo e inflamación crónica leve. Mx(-).



Muestra No.173 Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática y vascular. Necrosis tumoral 20% e inflamación + + +. Mx(-).

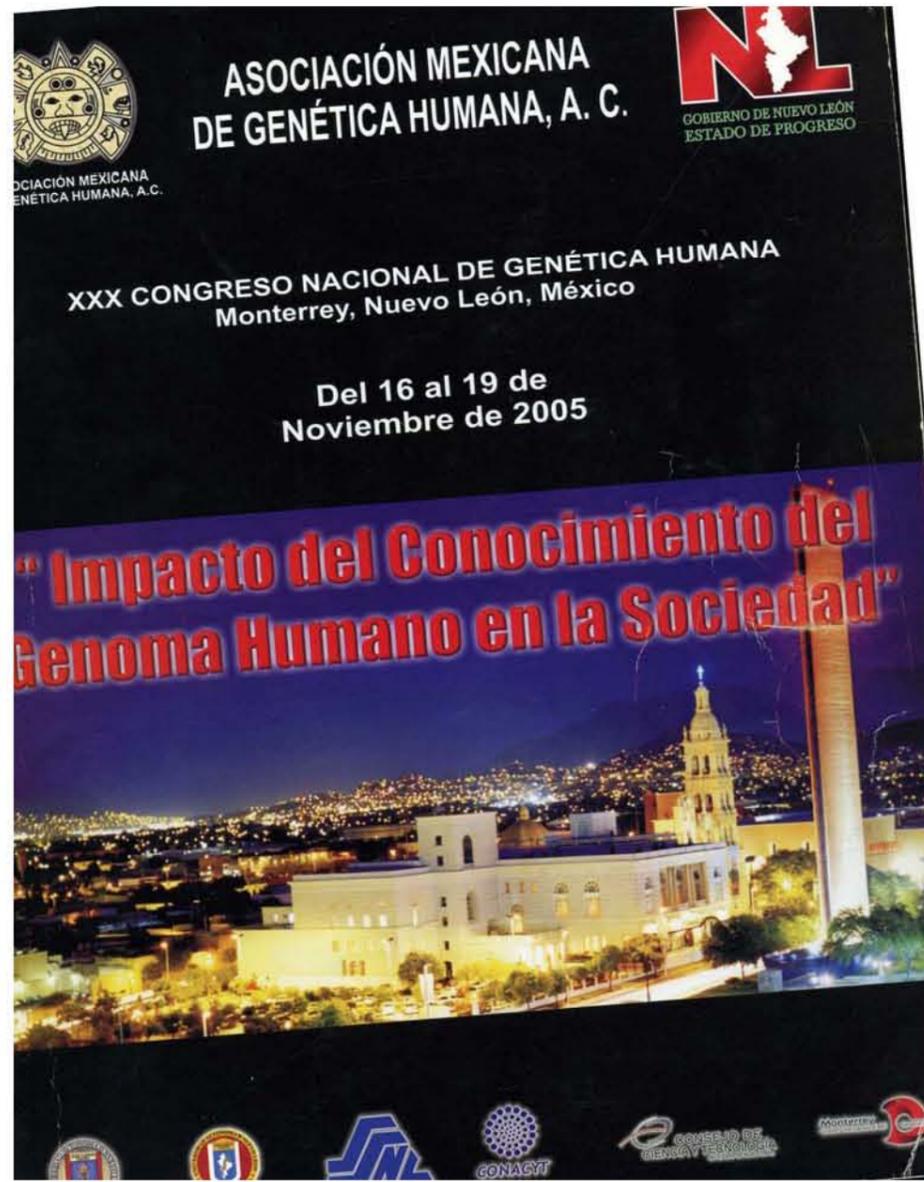


Muestra No. 86 Necrosis tumoral tipo comedo 5% Carcinoma de conductos infiltrantes con angioinvasión linfática. Mx(+) en ganglios.



HPRT. Amplificado de 229 bp.

ANEXO II



Jueves 17 de Noviembre

ORAL 1

Salón Nuevo León 1

Coordinadora: Dra. Ana Laura Calderón Garcidueñas

HORA	TRABAJO	AUTOR	CODIGO
8:30-8:45	ESTUDIO TEÓRICO DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y LAS PROPIEDADES ELECTRÓNICAS DEL PÉPTIDO ANTINEOPLÁSICO PNC-27	Barrientos-Salcedo Carolina	CA01
8:45-9:00	DISEÑO DE UN DISPOSITIVO PARA CONSTRUIR MICROARREGLOS DE TEJIDO DE ALTA DENSIDAD Y SU APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BIOPSIAS EMBEBIDAS EN PARAFINA DE CÁNCER DE MAMA.	García-Hernández Normand	CA02
9:00-9:15	ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS L Y S DEL GEN MCL-1 EN CANCER DE MAMA.	González-González Miryam	CA03
9:15-9:30	TRANSCRIPCIÓN DE BORIS Y CTCF EN MASTOPATÍA FIBROQUÍSTICA	Lazalde-Medina Brissia	CA04
9:30-9:45	PATRONES DE METILACION Y NIVELES DE EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO BCR/ABL EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)	Ruiz-Sánchez E.	CA05
9:45-10:00	Preguntas y discusión		

CA03. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS L Y S DEL GEN MCL-1 EN CANCER DE MAMA.

Miryam González-González, Diego J. Arenas-Aranda., Carolina Barrientos-Salcedo, Fabio Salamanca-Gómez, Normand García-Hernández, *María Dolores Vergara, *Mónica Sierra Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana, CMN SXXI, IMSS, *Lab. de Genética Humana, Hospital Juárez de México. E-mail: mir_tiziar@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Mcl-1, apoptosis, cáncer de mama*

Introducción. El cáncer de mama se presenta actualmente como la segunda causa de muerte en nuestro país. Dentro de los factores relacionados con el desarrollo o la progresión tumoral, se encuentran aquellos mecanismos que participan en la regulación del ciclo celular como la apoptosis; proceso biológico fundamental que involucra tanto a genes de transcripción como de traducción y que está estrictamente regulado; sin embargo, un balance inapropiado a nivel de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas causa a nivel molecular, la expresión anómala de genes que regulan la muerte celular programada, tal es el caso de Mcl-1, miembro de la familia Bcl-2 que presenta 2 variantes, las isoformas L y S las cuales participan suprimiendo o promoviendo la apoptosis. El gen Mcl-1 se encuentra localizado en el cromosoma 1q21, tiene una vida media corta y está conformado por tres exones codificantes para proteínas (1). Mediante empalme alternativo se originan dos mRNAs distintos, que codifican para Mcl-1L, isoforma que contiene el segundo exón, puede ser hidrolizada por las caspasas dando como resultado una proteína anti-apoptótica capaz de antagonizar la acción de Mcl-1S (2), segunda isoforma, que carece del exón dos y que en contraste a Mcl-1L, promueve la muerte celular programada. Mediante estudios de microarreglos de expresión en tumores mamaros de mujeres mexicanas, nuestro grupo encontró sub-expresado en un alto porcentaje al gen Mcl-1 (3), sin embargo no se definió cual de las isoformas presentó ese comportamiento. En base a lo anterior en este trabajo se analizó la expresión de las isoformas L y S en tumores mamaros de mujeres mexicanas, con la finalidad de determinar si se pueden emplear como marcadores de diagnóstico en esta patología tan frecuente en nuestra población.

Material. Se utiliza RNA extraído de muestras de tumores mamaros de mujeres mexicanas, pacientes del Hospital Juárez de México y que corresponden a los estadios de dicho cáncer.

Métodos. Partiendo de su previa cuantificación espectrofotométrica, se realiza un RT-PCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados con los programas Oligo y DNAMAN para cada isoforma, según las secuencias publicadas en el GeneBank y cuyos números de acceso son: NM 021960 y NM 182763. Para la isoforma L, se construyeron iniciadores del exón uno al dos y del exón uno al tres y para la isoforma S del exón uno al tres. La reacción de PCR se realiza con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 10min, 30 ciclos de 94°C 30 seg, 58°C 30 seg, 74°C 30 seg y finalmente 74°C 10 min. Los productos obtenidos se analizan en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con EtBr. El tamaño de los amplificadores se compara con

marcador escalera de 123 bp.

Resultados. Hasta el momento, los resultados obtenidos en dos de las muestras sometidas a este ensayo, corresponden a la expresión de las isoformas buscadas. Los amplificadores que se observan son de 487 bp para la isoforma L del exón uno al dos y de 583 bp para la misma isoforma pero del exón dos al tres; amplificado que se utiliza como control interno, para asegurarse de que se trata realmente de la isoforma buscada y de 329 bp para la isoforma S del exón uno al tres. En una de las muestras, se confirma la actividad antagonista de una de las isoformas respecto a la otra, ya que mientras Mcl-1L se expresa, Mcl-1S no; mientras que en otra de las muestras diagnosticada como un carcinoma infiltrante, ninguna de las isoformas está presente.

Conclusiones. Se observa que una de las isoformas, Mcl-1 S, se encuentra sobre expresada en relación a la variante anti-apoptótica Mcl-1 L, el tamaño de los amplificadores corresponde a los esperados; sin embargo existe la presencia de bandas inespecíficas que corresponden probablemente a otras isoformas del gen.

Agradecimientos. El presente trabajo fue apoyado por los proyectos No. 34451-M y Salud-2003-C01-074 del CONACYT.

Bibliografía.

1. Michels J, et al. (2004). Molecules in focus Mcl-1. *IJBCB* 37:267-271.
2. Bae J, et al. (2000). Mcl-1S, a splicing variant of the antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275:25255-61.
3. García N, et al. (2005). A molecular analysis by gene expression profiling reveals BIK/NBK overexpression in oradic breast tumors samples of Mexican females. *BMC Cancer* 5:93.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA, A. C.



Otorga la presente
CONSTANCIA

Miryam González-González, Diego J.^a Arenas-Aranda., Carolina Barrientos-Salcedo, Fabio Salamanca-Gómez, Normand García-Hernández, Maria Dolores Vergara, Mónica Sierra

Por la presentación de su trabajo

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS L Y S DEL GEN MCL-1 EN CANCER DE MAMA

Presentado en la sesión de Trabajos Libres modalidad oral

XXX CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA

MONTERREY, N.L. 16 AL 19 DE NOVIEMBRE DE 2005


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Presidente


Dr. Ricardo M. Cerda Flores
Secretario


Dr. Augusto Rojas Martínez
Tesorero

