



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS A Y B DEL GEN BETA CATENINA EN CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ROJO GÓMEZ FRANCISCO JAVIER

ASESORA:

DRA. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO

**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO
2008**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis por sus consejos y sugerencias, por su paciencia y su disposición, pero sobre todo por sus sabios consejos, mil gracias:

M. en C. Irma Elena Dueñas García.

Dr. Ricardo Mejia Zepeda.

Dra. M. Elena Hernández Caballero.

Dr. Diego Julio Arenas Aranda: gracias por esas estupendas y maravillosas clases que imparte, por sorprenderme cada vez que las tomaba y así ayudarme a decidir que es lo que realmente me gusta la “biología molecular y la genética”, y muchas gracias por haberme dado la oportunidad y la confianza al haberme aceptado en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y por enseñarnos día con día que hay que trabajar con pasión y entrega, que todos los días hay cosas nuevas y maravillosas que debemos de aprender.

Dra. Carolina Barrientos Salcedo: Primero que nada muchas gracias por haberme aceptado como uno de sus estudiantes, gracias por el tiempo dedicado, por sus conocimientos compartidos, por inculcarme el vicio de la investigación, por sus consejos en todos los aspectos, por los jalones de oreja cuando me los merecía, por hacer que mi cerebro trabaje un poco mas, por demostrarme que uno puede hacer todo lo que se proponga, por todo el apoyo, por su comprensión, por todo la paciencia y por todas las facilidades para que esta tesis se realizara. Gracias, mil gracias doctora por haberme dado la oportunidad de conocer y trabajar a lado de una mujer tan sabia como usted gracias!!!!!!!!!!!!

Al M. en C. David Essau Fragoso Fonseca: por toda la ayuda para la realización de esta tesis ya que sin ella hubiera sido mas difícil recorrer el camino, muchas gracias!!!!!!!

A las siguientes personas por la ayuda, recomendaciones y comentarios que me brindaron en algún momento de mi estancia en el laboratorio gracias.

Dra. Rosenda Peñalosa.

Dr. Normand García.

QFB. José Antonio Cervantes.

QFB. Mario Flores.

M. en C Alejandro Monsalvo Cruz.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, gracias por haberme aceptado y así poder decir: “soy U.N.A.M.” y a mucha honra, gracias!!

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por haberme inculcado el amor hacia la carrera de biología, por haber sido mi segundo hogar los últimos años, por todas las experiencias ahí vividas y por todos los conocimientos adquiridos dentro de ese recinto y por crear en mi el orgullo de ser un universitario egresado de le FES-I.

DEDICATORIAS

A mi mama[†] por haberme dado la vida.

A mis queridos abuelitos Nora y Salvador, por haberme permitido vivir tantos años con ustedes, por el cariño, amor y protección que siempre me han demostrado, por haberme dado todo a cambio de nada, les voy a estar agradecidos toda la vida los adoro!!!!!!!

A mis padres Francisco y Lourdes: Papá gracias por todo el amor, cariño y apoyo que me has brindado todo estos años, gracias por haberme dado todo lo que estaba en tus manos y lo que no también, gracias por ser un amigo, por todos los consejos y regaños. Lu gracias por haberme dejado ser un hijo para ti y por haber sido una mamá para mí, gracias por todo el cariño, el amor y sobre todo gracias por todo el apoyo, los amo por que son los mejores padres del mundo y ojalá estén orgullosos de mi como yo de ustedes ya que por fin lo logre, lo logramos!!!!!!!!!!!! si!!!!!!!!!!!!

A mi hermano Alejandro: Pepe gracias por todo el cariño y apoyo que siempre me has mostrado. Por que siempre me defendiste de todo y ante todo, por que siempre me cuidaste y protegiste, por todas las vivencias compartidas y lecciones aprendidas gracias!!!

A mi hermano Edgar y su esposa Tania: Ger gracias por todo el apoyo incondicional que siempre me has brindado, por los consejos, por los regaños, por el cariño, por que me has demostrado que nunca hay que dejarse vencer por nada y superar todo; pero sobre todo por que eres un ejemplo en toda la extensión de la palabra y en todos los aspectos. Tina por esa alegría que te caracteriza, por el cariño y por que me has

demostrado que hay que reír ante la peor situación del mundo ya que uno siempre va a salir adelante de todo, gracias a los dos de todo corazón.

A mi hermana Argelia: Por todo lo que vivimos de niños, por los sueños compartidos, las risas y las ilusiones, por las peleas, las pláticas, por que siempre cuidaste de mí, por enseñarme a ser fuerte, por todo el apoyo que siempre me has dado y por que siempre has confiado en mí gracias!!!

A mi hermano Toño: Gracias por haber llegado a este mundo ya que cuando lo hiciste me alegraste la vida con tus risas, tus primeros pasos, tus primeras palabras, tus travesuras y tus ocurrencias, por todo el tiempo compartido y el que no también, por tu peculiar forma de ser, por que siempre estas dispuesto a escuchar con detenimiento y asombro y por que llevas lo universitario, lo U.N.A.M. en la sangre lo se lo se!!!!

A mis tíos Alejandra, Luz Maria, Salvador y Sandra: Gracias por todo el cariño y apoyo demostrado durante todo este tiempo, gracias por todos los consejos los regaños y la amistad demostrada, por que sin ustedes tal vez no estaría escribiendo esto, gracias por ayudarme a forjar un carácter fuerte y a ser una mejor persona, por que los adoro y ustedes me adoran lo se!! gracias!!!!!!

A unas pequeñas lucecitas: Mis primas Rebeca y Daniela, y a mis sobrinitos Daniel, Elías, Itzel y al que viene en camino a todos ustedes por que pueden hacer que salga el sol en un día nublado con sus ocurrencias, sus risas, sus travesuras, por ser un motor de superación día a día y por que con ustedes recuerdo lo maravilloso y divertido que es ser niño, gracias por haber venido a este mundo y hacer mi vida mas placentera si!!!!!!

A Pilar: Por ser mi amiga, mi compañera, mi amor, por todo el apoyo durante todo este tiempo, por que siempre que te necesito estas a mi lado, por que nunca me has

dejado caer, por que mis problemas y logros los has hecho tuyos, por los sueños que hemos cumplido, por los que se están cumpliendo, por los que queremos cumplir, por todo lo que hemos aprendido juntos, por todos esos momentos de inmensa felicidad que he vivido contigo y que seguiré viviendo, por que te adoro, por que te amo y por que se que tu también, lo logramos puga!!!! lo logramos piita!!!! siiiiiiii

A Mayra: Gracias mosca por que desde el primer día en la universidad fuiste y seguirás siendo mi amiga, gracias por estar siempre ahí en las buenas y en las malas y por todo lo que compartimos a lo largo de toda la carrera dentro y fuera de la universidad gracias mosca gracias!!!!!!!!!!!!

A David: Chato gracias por todos los consejos, por todo el apoyo, por que siempre que lo necesitaba ahí estabas y se que estarás ahí siempre, por todas las experiencias que compartimos dentro y fuera del salón de clases, en las prácticas, en el campo de fútbol o lejos de la universidad, gracias brother, gracias carnal, gracias AMIGO

A Linda: Por la compañía de los primeros semestres cuando éramos antisociales (bueno tu lo sigues siendo), por todas las veces que te hice esperar tan tarde, por las platicas, por todos los consejos, por tu sinceridad, por ser como eres, gracias amiga!!!

A mis compañeros de la carrera, Yered, David (chino), Alejandro, Ruth, Nec, Rosibel: Por todo el tiempo compartido dentro y fuera de la universidad, por su compañía voluntaria e involuntaria, por hacer que la universidad fuera tan placentera gracias!!!!

A la Profesora Tony Trujillo: Gracias por todo ese tiempo que nos dedico para que pudiéramos pasar esa materia tan difícil, gracias por que tal vez de no haber sido por usted no estaría escribiendo esto, gracias por esos jalones de oreja, gracias por compartir con nosotros sus conocimientos gracias profesora!!!

Al Profesor Arturo Tovar: Gracias por todos esos consejos dentro y fuera de la universidad, gracias por brindarme su amistad, por todo el apoyo, pero mas que nada gracias por demostrarme que la edad no es una limitante para poder llamar a alguien amigo¡¡ gracias Prof.¡¡¡

A los compañeros de laboratorio: José Luis, José, Silvia y Alma, gracias por la compañía, por hacer que las horas de trabajo pasaran como si nada, por las platicas, los consejos, por hacer que la estancia en el laboratorio fuera tan agradable, pero mas que nada gracias por que nunca es tarde para conocer a tan excelentes personas y poder llamarlos amigos, gracias¡¡¡

A mis carnales de la Banda EVEN: Alejandro, Luis (Quijano), Julio y Luis (pulpo), gracias por todo el apoyo, por la compañía, por que siempre que se les necesita ahí están y por que se que ahí seguirán sin importar la hora y el día, gracias carnales, yeah¡¡¡¡¡

A la familia Badillo Suárez: Sr. Andrés, Sra. Sara y Giovanni, gracias por abrirme las puertas de su casa y por todos los buenos tratos, muchas gracias¡¡¡

A la familia Suárez Noyola: A todos y cada uno de los ángeles que componen esa hermosa familia, muchas gracias por todas las atenciones, las pláticas, los consejos, el apoyo, muchas gracias por todo¡¡¡¡¡

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	6
Cáncer de mama	7
El gen beta catenina (<i>CTNNB1</i>)	9
El proceso de “splicing” (corte y empalme alternativo)	16
“Splicing” (corte y empalme alternativo) en el gen beta catenina	19
Isoformas	20
ANTECEDENTES	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPOTESIS	24
Hipótesis nula.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Extracción de RNA.....	27
Transcripción Reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	28
Purificación de los productos de PCR.....	29
Marcado y Secuenciación de los productos amplificados por PCR.....	30
Análisis mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	30
RESULTADOS.....	31
RT – PCR.....	32
Resultado de la secuencia de la banda de 613 pb	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	43
ANEXOS	44
BIBLIOGRAFÍA.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Anatomía del seno, los ganglios y vasos linfáticos.....	8
Figura 2.- Localización de la banda p22-p21.3 en el cromosoma 3	9
Figura 3.- Esquema de la ruta Wnt	10.
Figura 4.- Representación esquemática de los dominios de beta catenina	11
Figura 5.- Representación de la ruta de beta catenina	13
Figura 6.- Ejemplo de “splicing” (corte y empalme alternativo)	18
Figura 7.- Ejemplificación de los 16 exones y el sitio aceptor donde se encuentra el “ splicing” (corte y empalme alternativo)	20
Figura 8.- Diagrama donde se observa la extracción de RNA.....	27
Figura 9 .- Diagrama donde se observa la purificación de productos de PCR	29
Figura 10.- Gel de agarosa al 2% para el análisis cualitativo de RNA.....	31
Figura 11.- Muestras 1, 5 y 4 de tejido tumoral.....	34
Figura 12.- Muestra 2 de tejido tumoral	34
Figura 13.- Muestra 6 de tejido adyacente sano.....	35
Figura 14.- Muestras 7 y 8 de tejido adyacente sano	35
Figura 15.- Muestra 9 de tejido adyacente sano.....	35
Figura 16.- Electroferograma de la secuencia del amplificado del gen beta catenina .	37
Figura 17.- Resultados del alineamiento con el programa BLAST	38
Figura 18.- Secuencia con mayor homología encontrada en la base de datos del BLAST.....	38

Figura 19 .- Organismos en donde se encuentra el gen beta catenina	39
Figura 20.- Exón16.....	39
Figura 21.-Diferencias de longitud de los 16 exones del gen beta catenina	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genes activados directa o indirectamente por el complejo Beta-Catenina/Tcf-4	14
Tabla 2.- Relación de las muestras de tejido afectado de pacientes analizados.....	26
Tabla 3.- Relación de las muestras de tejido adyacente sano de pacientes analizados	26
Tabla 4.-Concentraciones de RNA obtenidas de las muestras de tejido afectado y tejido adyacente sano.....	32
Tabla 5.- Expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en tejido tumoral ..	33
Tabla 6.- Expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en tejido adyacente sano	33

RESUMEN

Introducción. En nuestro país el cáncer de mama (CM) ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 25 años. El cáncer de mama es muy complejo, ya que están involucrados varios genes en su desarrollo, progresión y metástasis, uno de ellos es beta catenina (*CTNNB1*); actúa como oncogén cuando se transloca al núcleo, y se une al factor de las células T o factor linfoide amplificador activando sus genes blanco. Dentro del exón 16 del gen de estudio, se encuentra un sitio aceptor de empalme alternativo que da como resultado dos isoformas, una silvestre (B) y una con 159 pb extra (A). **Objetivo.** Analizar la expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en muestras de cáncer de mama. **Materiales y métodos.** Se obtuvo cDNA a partir de RNA total de muestras de tumores y de tejido adyacente sano de 5 mujeres mexicanas. Se amplificó mediante PCR el gen beta catenina y el producto fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa. **Resultados y Discusión.** Las isoformas A y B están presentes sólo en las muestras de tumor, esto coincide con los resultados obtenidos en un trabajo previo que se realizó en tumor de Wilms, en donde la isoforma A sólo se expresó en el tejido tumoral y la isoforma B se presentó en tejido adyacente sano. Esto sugiere que la isoforma A tiene relación con el proceso de transformación maligna. **Conclusiones.** En las muestras analizadas de cáncer de mama, se observa la presencia de ambas isoformas del gen beta catenina.

INTRODUCCIÓN

En el cuerpo humano ocurre una enorme producción celular, por lo que el organismo mantiene una homeostasis por largos periodos. Este correcto control sobre la multiplicación es conseguido por una red de mecanismos moleculares superpuestos que determinan la proliferación y diferenciación o la muerte celular programada (apoptosis). Cualquier factor que altere este balance tiene el potencial, si no es corregido, de alterar el número total de células en un órgano o tejido particular. Después de muchas generaciones de células, éste incremento podría ser clínicamente detectable como neoplasia¹.

El cáncer entonces, se desarrolla cuando una célula en cualquier tejido escapa a los procesos normales de control y se multiplica rápidamente, eventualmente superando todas las defensas del cuerpo².

Se sabe que hay alrededor de 20,500 genes³ y puede haber alrededor de 300 mil proteínas en un organismo, debido a las variantes por empalme alternativo y modificaciones postraduccionales. El cáncer ha sido llamado “el mal de los genes”. La teoría del “daño múltiple” sugiere que, las células acumulan daño aleatorio en sus genes (mutaciones). Por accidente, algo del daño ocurre en genes críticos que normalmente controlan la proliferación y la supervivencia de las células. Sí alguna célula acumula suficientes daños para destruir los frenos genéticos que los mantienen con un funcionamiento adecuado, esa célula puede crecer fuera de control y fundar una dinastía de células dañinas, una neoplasia².

Como se mencionó anteriormente el cáncer es una enfermedad que se produce por alteración de los genes, resultando del daño al DNA de diverso tipo, lo cual finalmente da como resultado distorsiones ya sea en la expresión o en la función bioquímica de los genes⁴.

Muchas son las evidencias experimentales que apoyan la idea anterior, es decir que en el daño genético está el origen del cáncer.

- 1) Predisposición hereditaria al cáncer.
- 2) Las células cancerosas presentan con frecuencia aberraciones cromosómicas.

- 3) Relación entre baja habilidad de la célula para reparar DNA dañado y susceptibilidad al cáncer.
- 4) Relación entre potencial mutagénico de algunas sustancias y carcinogenicidad.
- 5) Oncogenes que están en tumores humanos y al introducirlos en células normales pueden causar cáncer⁴.

Si bien los procesos tumorales pueden presentar diversas manifestaciones clínicas, se considera que todos ellos tienen causas comunes que los desencadenan. Una serie de estudios epidemiológicos han indicado que entre las causas que pueden desencadenar un proceso tumoral están los factores biológicos (virus, hormonas), químicos (ciertas drogas y compuestos cancerígenos) y físicos (radiación gamma, UV, etc.); en general cualquier agente que dañe al DNA⁴; además de estos factores también hay causas epigenéticas que pueden estar involucradas en los procesos tumorales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las enfermedades más complejas y difíciles de entender dado todos los mecanismos que se ven involucrados en él. Varios investigadores han planteado métodos y formas diferentes de abordar esta enfermedad con la finalidad de explicar su origen, lograr una detección más temprana, y encontrar nuevos abordajes terapéuticos.

El cáncer de mama ha tenido una tendencia a aumentar en los últimos años por lo que se ha convertido en la neoplasia número uno en las mujeres mexicanas mayores de 25 años, constituyendo un problema de salud pública.

En el cáncer de mama se ven involucrados muchos genes tales como *BRCA1*, *BRCA2*, *Her2* y *beta catenina*. Este gen está involucrado en la adhesión célula-célula de tejido epitelial, al haber una desregulación en este gen o una sobreproducción desmedida puede activar a otros genes como *ciclina D1* y *c-myc* por lo que se le podría considerar un oncogén, además que depende de la actividad de *APC* el cual es considerado un supresor tumoral y algunos autores han puesto a beta catenina como la contraparte de *APC*.

Como se mencionó en la introducción, las isoformas resultantes de los procesos de "splicing" (corte y empalme alternativo) son importantes en la carcinogénesis y el gen beta catenina presenta un sitio aceptor de corte y empalme alternativo en el exon 16 dando como resultado la inserción de 159 pb. Lo anterior origina dos isoformas: una de 454 pares de bases (-159 pb) y una de 613 (+154 pb), de las cuales no se conoce la función de cada una de las proteínas a las que dan lugar, sin embargo, la observación de la expresión diferencial del mRNA, puede indicar que pudieran existir proteínas diferentes, teniendo que confirmarse dicha hipótesis.

En un estudio previo en tumor de Wilms, se observó que la isoforma de 613 pb se presentaba sólo en los tumores y en el tejido comprometido con ellos. a pesar de que los ambientes celulares propios de cada tejido son diferentes, los tumores de Wilms presentan un porcentaje importante de tejido epitelial al igual que el cáncer de mama. Lo que se plantea en este trabajo es ver la expresión de estas isoformas en cáncer de mama y ver si hay ausencia o presencia en tejido afectado con respecto al tejido sano adyacente.

CÁNCER DE MAMA

En nuestro país el cáncer de mama (CM) ocupa actualmente el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 25 años, con un 17.6%. Esta enfermedad presenta una tendencia al aumento de la mortalidad en nuestro país⁵.

Se estima que 15 a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de enfermedad, con un 5% al 10% de todos los casos de esta neoplasia atribuidos a susceptibilidad de alelos dominantes, y se han encontrado varios genes asociados a la enfermedad⁶.

Los senos (mama) son glándulas que pueden producir leche. Cada seno está situado sobre los músculos del pecho que cubren las costillas. Cada seno está dividido en 15 ó 20 secciones llamadas lóbulos. Los lóbulos contienen muchos lobulillos más pequeños. Los lobulillos contienen grupos de glándulas diminutas que pueden producir leche. La leche fluye de los lobulillos al pezón por unos tubos delgados llamados conductos. El pezón está en el centro de un área oscura de piel llamada la areola . Los espacios entre los lobulillos y los conductos están llenos de grasa. Los senos tienen también vasos linfáticos, los cuales transportan un fluido claro llamado linfa. Los vasos linfáticos se dirigen a órganos pequeños, redondos, llamados ganglios linfáticos. Grupos de ganglios linfáticos se encuentran cerca del seno en la axila, arriba de la clavícula, en el pecho detrás del esternón y en muchas otras partes del cuerpo (Figura 1). Los ganglios linfáticos atrapan bacterias, células cancerosas u otras sustancias dañinas que pueden estar en el sistema linfático⁷.

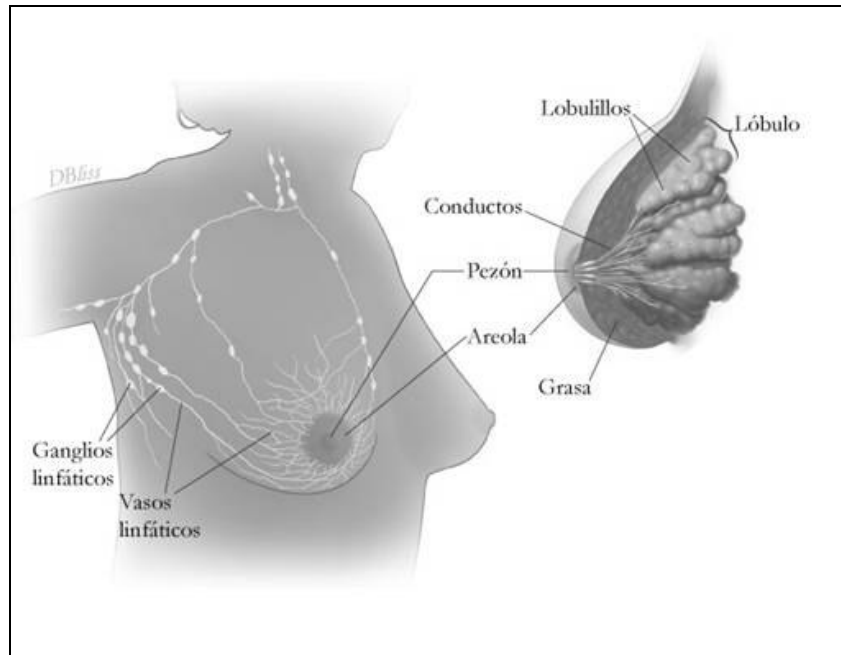


Figura 1.- Anatomía del seno, los ganglios y vasos linfáticos⁷.

Durante el desarrollo normal de las glándulas mamarias ocurre una diferenciación por variaciones en los niveles hormonales, hay cambios en la expresión de los genes, que desencadenan un proceso de madurez controlado por la información genómica. Durante este desarrollo, se pueden observar eventos tales como: Apoptosis en las células que están siendo sustituidas; proliferación y crecimiento de las células donde participan proto-oncogenes y genes supresores; angiogénesis para un abastecimiento de nutrientes de las nuevas células, etc⁸.

Estos cambios son regulados por factores de crecimiento, proteínas del ciclo celular, reguladores de invasión, interacciones célula-célula, la presencia de receptores celulares. Si durante estos eventos de desarrollo ocurre daño celular o alguna alteración durante la recombinación y fallan los sistemas de reparación, las células se salen del control normal⁸.

Al igual que en otros pocos tumores, la historia natural del cáncer de mama es normalmente muy larga. Se ha calculado que comenzando por una sola célula maligna, la masa tumoral crece por sucesivas duplicaciones, necesitando 7-8 años y 30 duplicaciones

para alcanzar la esfera de 1 cm. de diámetro. El cáncer de mama se disemina por vía linfática, por vía sanguínea y/o extensión directa⁹.

Se han descrito otros factores asociados al desarrollo de esta neoplasia en forma esporádica, que es la forma más común de este cáncer. Otras causas asociadas al cáncer mamario esporádico descritas son mutaciones en distintos genes⁷. Desde el punto de vista de genética molecular, el cáncer de mama es muy complejo, ya que están involucrados varios genes en su desarrollo, progresión y metástasis, como son *BRCA1*, *BRCA2*, *HER2*¹⁰ y *beta catenina (CTNNB1)*, el cual motiva este estudio.

EL GEN BETA CATENINA (*CTNNB1*)

El gen beta catenina, está localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p22-p21.3)¹¹ (Figura 2).

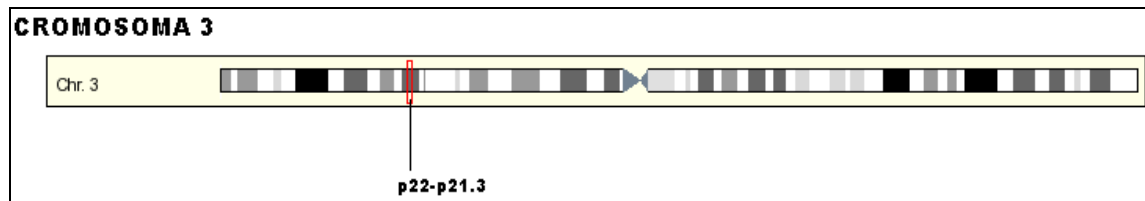


Figura 2.- Localización de la banda p22-p21.3 en el cromosoma 3¹².

Este gen codifica para una proteína que forma parte del complejo de adhesión celular¹³ y además participa en la ruta Wnt (Figura 3) que involucra al supresor tumoral APC (gen de la poliposis adenomatosa de colon) y los factores de transcripción Tcf-Lf^{14,15}. Las proteínas APC y la cinasa glicógeno sintetasa 3 beta (*GSK3β*), regulan los niveles de beta catenina^{16,17}. La expresión de beta catenina se altera frecuentemente en varios cánceres tales como mama, gástrico, colon, páncreas, hepatocelular y próstata^{18,19}. Actualmente no se conoce el papel de las isoformas que son producto de empalme alternativo, por ejemplo, algunos informes indican que en cáncer gástrico además de presentarse mutaciones, se incrementa la expresión de beta catenina durante la progresión y disminuye durante la metástasis^{20,21}. Estas variaciones de la expresión de beta catenina en los diferentes procesos del cáncer no se han identificado si se trata de formas alternativas de la proteína.

El gen beta catenina fue localizado por análisis de fluorescencia in situ (FISH) en la banda p22 a la banda p21.3 en el brazo corto del cromosoma 3 una región

frecuentemente afectada por alteraciones somáticas en una variedad de tumores. El análisis de un panel de células somáticas hibridadas confirmó la localización de beta catenina humana en el cromosoma 3¹¹.

La estructura primaria del gen beta catenina humano fue determinada por análisis de cDNA y clonas genómicas. El tamaño del gen completo fue determinado en 23.2 kb. Utilizando enzimas de restricción y análisis de secuencias parciales se revelaron 16 exones (Ver anexo I), con un intervalo de tamaño de 61 a 790 pb y con un total de 3362 pb. La mitad de los intrones fueron menores a 550 pb, siendo el más pequeño de 84 pb y el más largo de 6700 pb. El principal sitio para el inicio de la transcripción fue identificado en un residuo A de 214 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio ATG. La región 5' es altamente rica en GC y carece de cajas CCAAT pero contiene caja TATA y sitios potenciales de unión para diferentes factores de transcripción como NFkB, SP1, AP2 y EGR1¹³.

LA PROTEÍNA BETA CATENINA

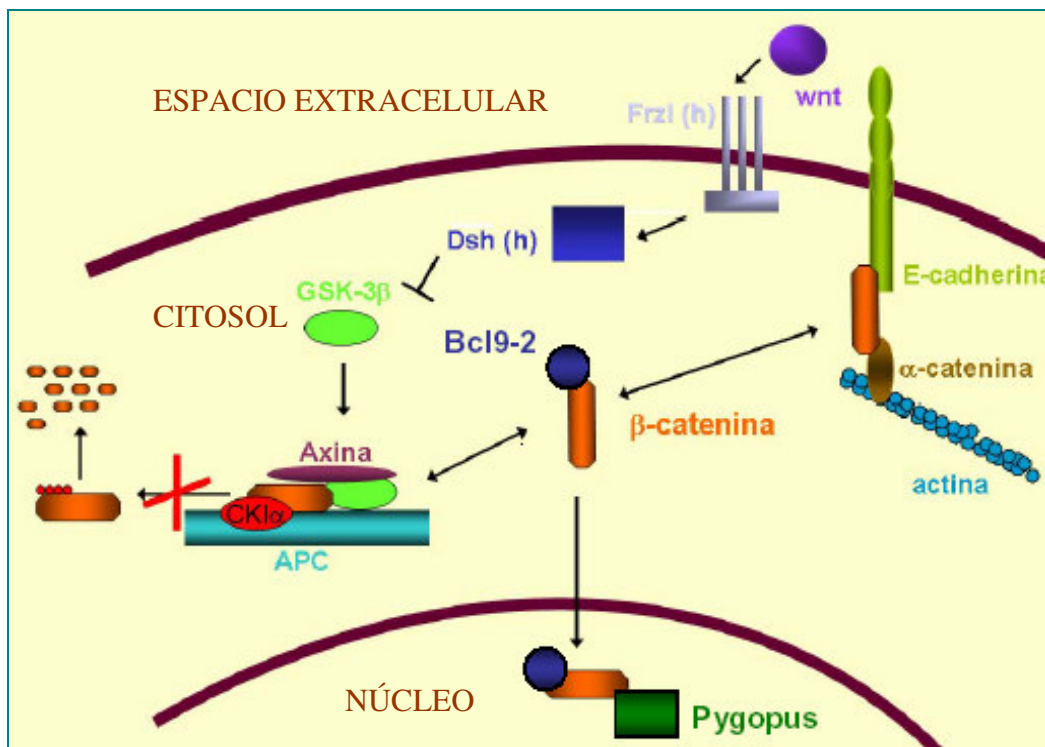


Figura 3.- Esquema de la ruta Wnt en donde se observa la participación de la proteína beta catenina²².

Beta catenina es una proteína que juega un papel central en numerosos procesos celulares además de ser miembro de la superfamilia “armadillo”. Este nombre deriva del homólogo de beta catenina en *Drosophila*, el gen de polaridad segmental armadillo, primer miembro descrito de esta familia²³. Todas comparten un dominio central característico denominado dominio armadillo. A través de esta región central beta catenina forma complejos con numerosas moléculas. La inserción de los 159 pb no modifican la estructura conformacional de los dominios armadillo solamente le sirven de unión a otras proteínas ya sea en la presencia o en la ausencia de estos pares de bases de más²².

La estructura primaria de beta catenina 781 aminoácidos consiste en tres dominios: un dominio N-terminal de 141 aminoácidos, un dominio armadillo central de 523 aminoácidos y un extremo C-terminal formado por unos 117 aminoácidos²⁴ (Figura 4).

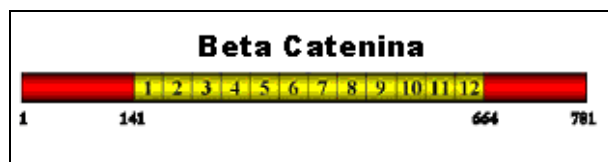


Figura 4.- Representación esquemática de los dominios de beta catenina. En amarillo cada una de las repeticiones armadillo y en rojo los extremos terminales²².

El extremo N-terminal contiene la zona de unión a α -catenina (aa 1-141)²⁴, así como sitios de fosforilación por la GSK3 β ²⁵. Por otro lado el extremo C-terminal (aa 666-701) es muy ácido y muchas proteínas de la maquinaria transcripcional interactúan en este dominio: la proteína de unión a la caja TATA (TBP)²⁶, la pontina, Teashirt, Sox 17 y 13, SMAD4 o la CREB^{27,28,29,30,31,32}. Además este dominio es esencial para la transcripción mediada por factores de transcripción de la familia Tcf/Lef^{33,34}. La adición de los 159 pb extras productos del corte y empalme alternativo pueden modificar la estructura conformacional de la proteína en el extremo C-terminal de beta catenina, además este extremo fusionado a Lef-1, es suficiente para promover transactivación de genes como *c-Myc* y *Ciclina D1* entre otros³⁵.

Las proteínas sustentan muchas de las funciones celulares tales como formar parte de la cascada de transducción de señales que comienza con la activación de un

receptor, ser responsables de la relación de la célula con su medio o de la célula con otra célula vecina y dar forma a la célula constituyendo el citoesqueleto³⁶.

Beta catenina es una proteína que interviene en dos procesos totalmente distintos: por un lado es una proteína estructural que forma parte de las uniones adherentes entre células epiteliales vecinas que son críticas para el establecimiento y el mantenimiento de las capas epiteliales; se une a la alfa y gama catenina, que a su vez se unen al citoesqueleto de actina de la célula y, además, se conecta con caderinas transmembranales que se relacionan con caderinas de células vecinas, constituyendo así un fuerte ensamblaje que conecta las células entre sí³⁶.

Pero también la beta catenina puede actuar fuera del complejo de los contactos focales activando factores de transcripción y provocando la activación de genes³⁷ (Ver tabla 1) De tal manera que regula el crecimiento y desarrollo normales de la célula en varios estadios de embriogénesis, participa en la cicatrización de heridas y en la metástasis tumoral. Es un componente de la ruta de señalización de Wnt, que está involucrada en la diferenciación renal³⁸; se ha aislado en tejidos tumorales, en cáncer de ovarios, hepatoblastomas, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, entre otros³⁷.

Beta catenina tiene otro papel adicional en la célula. Así, cuando no está unida a la E-cadherina ni a la α -catenina, la beta catenina puede translocarse al núcleo, unirse a factores transcripcionales de la familia Tcf (Tcf-4 en el epitelio intestinal) e inducir la expresión de un amplio número de genes, muchos de ellos implicados en tumorigénesis³⁹. Se ha determinado que la inhibición de la actividad transcripcional de este complejo detiene el crecimiento o induce apoptosis, dependiendo del tipo celular y del resto de señales recibidas por la célula^{40,41}.

El paso de beta catenina al núcleo está muy finamente regulado por la propia estabilidad de esta proteína libre en el citosol (no unida a E-cadherina). Es en este paso en el que el producto del gen *APC* juega un papel clave, en el control de los niveles citosólicos de beta catenina, ya que es necesario para que la beta catenina libre pueda ser fosforilada en su extremo N-terminal y posteriormente degradada por el proteosoma. La fosforilación de beta catenina ocurre en un complejo multiproteico formado por APC, la proteína acopladora axina que recluta la cinasa GSK3 β y la CKI α ^{17,42}.

Como resultado de la actividad de este complejo beta catenina es fosforilada inicialmente en la Ser 45 por la CKI α y secuencialmente por la GSK3 β en la Thr 41, Ser 37 y Ser 33. Como consecuencia de esta fosforilación beta catenina es poliubiquitinizada por la ubiquitina ligasa β -Trcp y posteriormente degradada por el proteosoma^{43,44}.

Existe un mecanismo de degradación de beta catenina diferente y que depende de la actividad del producto del gen *Siah-1*. Esta proteína, cuya expresión es activada por p53, interactúa con el extremo carboxilo terminal de APC y promueve la degradación de beta catenina independientemente de la fosforilación por GSK3 β y sin requerir la interacción de beta catenina con β -TrCP^{43,45,46}.

Cuando este sistema de regulación se altera beta catenina no puede ser degradada y se transloca al núcleo por un mecanismo independiente a la acción de importinas/carioferinas (Figura 5). Estas importinas son receptores nucleares de sustratos con secuencias de localización nuclear (NLS). Además, tienen dominios armadillo que interactúan con las NLS, secuencias de las que carece beta catenina. Se han descrito dos proteínas que parecen ser necesarias para la localización nuclear de beta catenina; Legless (lgs; Bcl9-2 en humanos) y Pygopus (Pygo)^{47,48}.

Pygopus se encuentra constitutivamente en el núcleo y sirve de anclaje en el núcleo para beta catenina, mientras que Legless, que se mueve entre el citoplasma y el núcleo, introduce a beta catenina en el interior del núcleo (proporcionándole la NLS)⁴⁹.

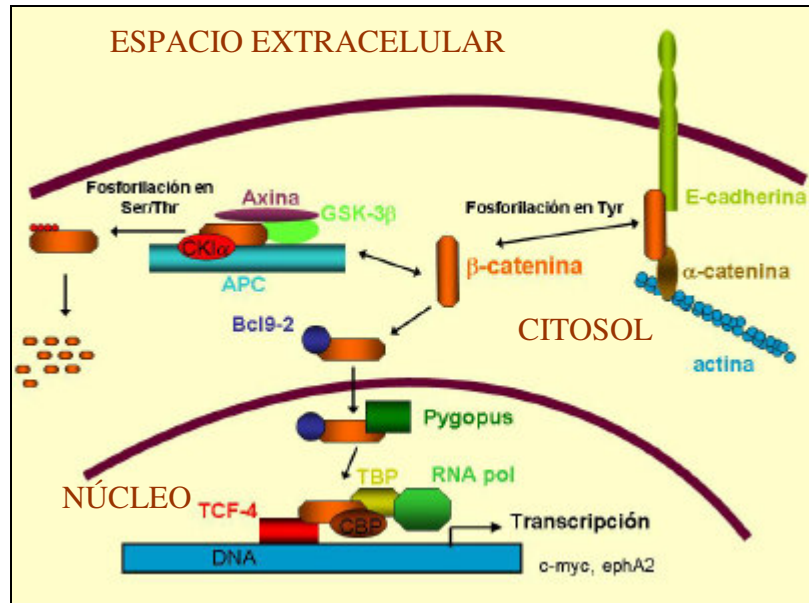


Figura 5- Representación de la ruta de Beta Catenina ²².

En el núcleo beta catenina interactúa a través de la región central de repeticiones armadillo con miembros de la familia de los factores de transcripción Tcf (*T cell factor*). Estos factores de transcripción pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios HMG (*High Mobility Group*) y fueron identificados inicialmente por su implicación en la diferenciación de las células T^{50,51,52}.

La proteína beta catenina, como todas las proteínas, está sometida a una cinética de síntesis y degradación y, por tanto, también se encuentra normalmente en estado estacionario; cuando la velocidad de síntesis es mayor que la de degradación tenemos una disponibilidad de beta catenina citoplasmática que no está unida a la actina, ésta se une a dos factores de transcripción (los llamados TCF y LEF) que resultan activados, se translocan al núcleo y determinan así la transcripción de una serie de genes específicos. Aunque por si solos estos factores son capaces de unirse al DNA por sus dominios HMG, necesitan interactuar por su extremo amino terminal con la beta catenina para activar la transcripción de genes implicados en proliferación y diferenciación³⁹ (ver Tabla I).

Tabla 1.- Genes activados directa o indirectamente por el complejo Beta-Catenina/Tcf-4²².

Gen	Función
c-Myc	Proliferación
Ciclina D1	Proliferación

Tcf-1	Diferenciación
PPARdelta	Proliferación / Diferenciación
c-jun	Diferenciación / Proliferación
fra-1	Diferenciación / Proliferación
uPar	Adhesión / Migración / Invasión
matrilina	Invasión / Migración
Axina-2	Degradación de Beta Catenina (CTNNB1)
Nr-CAM	Adhesión / Proliferación
ITF-2	Proliferación / Diferenciación
Gastrina	Proliferación
CD44	Adhesión
EphB	Repulsión / Adhesión
BMP4	Diferenciación
claudina-1	Adhesión
VEGF	Proliferación

Uno de los papeles esenciales del complejo Beta-Catenina/Tcf-4 consiste en reclutar coactivadores transcripcionales (p300/CBP) y complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF, histonadeacetilasas) hacia los promotores de los genes sensibles a la activación de la ruta de señalización de Wnt. Un componente esencial de este complejo transcripcional es TBP, que interactúa con dos dominios distintos de beta catenina necesarios para la transactivación²⁶.

Dada la naturaleza oncogénica de los diferentes blancos del complejo Beta-Catenina/Tcf-4, no es sorprendente que beta catenina sea considerada un oncogén, mientras que axina y APC se consideran supresores de tumores^{53,54,55}.

Mutaciones en APC ocurren en más del 85% de los tumores colorectales, tanto esporádicos como heredados. Adicionalmente, tumores con APC no mutada contienen mutaciones en otros componentes de la ruta Wnt, por ejemplo mutaciones en beta catenina que impiden que pueda ser fosforilada en serinas o treoninas y por lo tanto degradada^{53,56,57}.

Entre los genes afectados por beta catenina podemos destacar dos particularmente relevantes, la *ciclina D1* y *c-myc*. Estos genes son responsables, respectivamente, de que las células tumorales proliferen más rápidamente y no sean susceptibles a procesos de diferenciación terminal. Otros genes afectados por beta catenina parecen estar relacionados con estadios más avanzados dentro del proceso de tumorigénesis, como la proteasa matrilina o *CD44*, que se han relacionado con procesos invasivos. Esta acción pleiotrópica de beta catenina ha originado que la

interferencia selectiva de su actividad transcripcional sea considerada como una diana prometedora para la acción de compuestos con actividad antitumoral, posiblemente con alta eficacia y poca toxicidad^{58,59}.

Por otra parte, el exceso de beta catenina, dada su unión a E-caderina, altera la estructura de las “zónulas adherentes”, que mantienen unidas las células entre sí, lo que lleva a alteraciones en los mecanismos de comunicación intercelular que favorecen la transformación maligna⁵⁹. Beta catenina actúa como oncogén, cuando se transloca al núcleo, se une al factor de las células T o factor linfoide amplificador y actúa como activador de sus genes blanco. En cáncer de mama, tumor de Wilms, cáncer de colon y otros, beta catenina y otros genes de la vía de Wnt se sobre expresan y se ha demostrado que inducen proliferación celular anormal en los mismos³⁷.

EL PROCESO DE “SPLICING” (CORTE Y EMPALME ALTERNATIVO)

Los genes interrumpidos se encuentran en todos los organismos eucarióticos, representan una proporción pequeña de los genes de los eucariotas inferiores pero son la inmensa mayoría de los genes de los genomas eucarióticos superiores. Los genes pueden variar ampliamente de acuerdo con el número y longitud de sus intrones, pero un gen típico de mamíferos tiene de 7-8 exones diseminados a lo largo de más de unas 16 kb. Los exones son relativamente cortos (unos 100-200pb) y los intrones son relativamente largos (>1kb)⁶⁰.

La discrepancia entre la organización interrumpida del gen y la organización ininterrumpida de su mRNA la explica el procesado del producto primario de la transcripción. El transcrito primario tiene la misma organización que el gen, y a veces se le llama pre-mRNA. La eliminación de los intrones del pre-mRNA deja un mensajero típico (mRNA) de 2.2kb. El proceso por el cual se eliminan los intrones se llama corte y

empalme . El empalme se produce en el núcleo junto con otras modificaciones como la adición de la capucha en el extremo 5´ y la poliadenilación en el extremo 3´.Una vez procesado, el mRNA es transportado a través de los poros nucleares al citosol donde se lleva a cabo su traducción⁶¹.

Considerando el mecanismo de cómo los intrones son cortados y empalmados,se pueden agrupar en al menos 4 tipos. Aquéllos presentes en los tRNA precursores, los intrones autocatalíticos clase I y clase II, generalmente presentes en los genomas de organelos (mitocondria y cloroplasto) y los intrones de pre-mRNA correspondientes a genes nucleares. Los intrones así agrupados permiten definir al menos 4 sistemas de empalme con diferentes características dependiendo del tipo de intrón en cuestión⁶².

Cada uno forma un tipo característico de estructura secundaria/terciaria. Las secuencias de un grupo están relacionadas con aquellas de los intrones nucleares. Los intrones se eliminan de los pre-mRNAs nucleares de los eucariotas superiores por un sistema que reconoce solamente secuencias consenso cortas conservadas en los límites exón-intrón y dentro del intrón. La alta conservación de los puntos de empalme se encuentra inmediatamente dentro del intrón y en las supuestas uniones. Esto identifica la secuencia de un intrón genérico como: GT--AG. Esta reacción de corte y empalme necesita un aparato de gran tamaño: el spliceosoma. El corte y el empalme de los pre-mRNAs tiene lugar en el spliceosoma, un gran complejo compuesto por 4 pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (U1, U2, U4/U6 y U5 snRNPs) y aproximadamente 50-100 factores de empalme no snRNPs como por ejemplo: algunos factores de empalme como ASF-1, ASF-2 y otros factores o proteínas SR (que contienen motivos ricos en Serina y Arginina). Se organiza de una forma secuencial, y se pueden conocer varios intermedios. El spliceosoma tiene dos funciones: Reconocimiento y selección de los lugares de empalme o Catálisis de las dos reacciones secuenciales de transesterificación⁶².

Etapas del empalme en intrones nucleares:

1ª etapa. Se lleva a cabo un corte en el punto de empalme 5, separando el exón izquierdo del intrón derecho. El exón izquierdo adopta la forma de molécula lineal y el extremo 5´ generado del intrón queda ligado por una unión 5´-3´ a un nucleótido dentro del intrón

2ª etapa. Un corte en el punto de empalme 3' libera el intrón en forma de lazo, mientras que el exón derecho queda ligado al exón izquierdo. El intrón es desramificado y escindido, degradándose rápidamente.

3ª etapa. El empalme nuclear se produce por dos reacciones de transesterificación en las que un extremo libre de OH ataca nucleofílicamente a una unión fosfodiéster⁶³.

El proceso de corte y empalme alternativo permite la inclusión y/o sustitución opcional de algunos exones dentro de un marco de empalme proporcionado por los exones constitutivos (Figura 6). Las isoformas de proteínas traducidas a partir de dichas formas de mRNA resultantes comúnmente varían dentro de los dominios de especificidad funcional mientras comparten funciones comunes. El corte y empalme alternativo también puede conducir a una secuencia de mRNA terminación prematura, o generar secuencias de mRNA en dos marcos de lectura diferentes⁶⁴.

La mayoría de los productos de corte y empalme alternativo son importantes reguladores de funciones celulares; se conocen modelos de empalme alternativo que regulan funciones tan importantes como la determinación sexual o la muerte celular en un organismo⁶⁴.

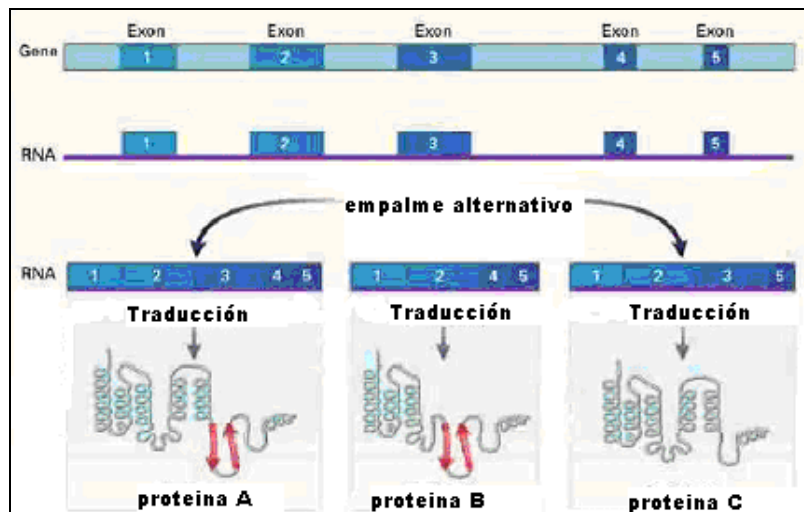


Figura 6.- Ejemplo de “splicing” (corte y empalme alternativo)⁶⁴

El corte y empalme alternativo invalida la vieja teoría “un gen una proteína”, siendo por tanto necesario información externa para decidir que polipéptido será sintetizado. Al mismo tiempo este sistema permite almacenar la información de forma más económica. Así, por ejemplo, este sistema permite obtener varias proteínas a partir de una única secuencia de DNA⁶⁵.

Algunos investigadores han sugerido que este sistema permitiría obtener nuevas proteínas cambiando los mecanismos de regulación. También se ha sugerido que este sistema permitiría una evolución más rápida. Existe una creencia que afirma que los sitios alternativos de empalme son responsables de la complejidad de los humanos; afirmando que los genes humanos tienen más sitios alternativos de empalme. Sin embargo un estudio de David Brett⁶⁵ y colaboradores afirma que no existen diferencias significativas entre el número de sitios de empalmes alternativos de humanos con otros animales. Actualmente el récord de sitios alternativos de empalmes lo tiene el gen *Dscam* (Down Syndrome Cell Adhesión Molecule) de *Drosophila* con 38000 variantes de empalme⁶⁵.

“SPLICING” (CORTE Y EMPALME ALTERNATIVO) EN EL GEN BETA CATENINA

El corte y empalme alternativo es un mecanismo mediante el cual la expresión de un gen puede dar lugar a diferentes proteínas, a través de mecanismos de sustitución o inserción/delección de determinados fragmentos de la secuencia de la proteína⁶⁶ (mas adelante se describe el proceso).

Como se describe en la literatura, el corte y empalme alternativo es un mecanismo de regulación de los factores de transcripción; mediante este mecanismo se pueden modificar la afinidad y la especificidad de unión al DNA, la activación, la represión y la dimerización de proteínas; lo cual puede ser específico de diferentes etapas del desarrollo embrionario⁶⁷.

Dentro del exón 16 del gen en estudio, se encuentra un sitio aceptor de empalme alternativo (ag-ga) reducido en la secuencia 3' en 159 pb⁵⁹.

```
(CTGTATTGTCTGAACTTGCATTGTGATTGGCCTGTAGAGTTGCTGAGAGGGCTCGAG  
GGG  
TGGGCTGGTATCTCAGAAAGTGCCTGACACACTAACCAAGCTGAGTTTCCTATGGGA  
ACA  
ATTGAAGTAACTTTTTGTTCTGGTCCTTTTTGGTCGAG)13
```

El efecto del corte y empalme alternativo sobre la variabilidad de las proteínas puede llegar a ser enorme, como por ejemplo en el caso de la proteína Dscam en *D. melanogaster*, para la cual se ha postulado la existencia de más de 38000 isoformas posibles, un número superior al total de genes predicho para *Drosophila*. Aunque estas cifras son extremas, nos dan una idea de la capacidad del empalme alternativo para generar variabilidad. Sin embargo, y a pesar de su importancia, todavía no se sabe prácticamente nada de la manera en la que el empalme alternativo modula la función de las proteínas⁶⁸.

Como era de esperar, también se ha observado una clara relación entre patrones de corte y empalme anómalos y patologías. Por ejemplo, se ha observado que el corte y empalme alternativo puede estar asociado a diversas patologías del sistema nervioso, a procesos cancerígenos, etc.⁶⁸; de tal manera que como resultado de este procesamiento, se pueden expresar varias isoformas.

ISOFORMAS

Las isoformas son diferentes formas de una proteína a partir de genes distintos o del mismo gen por corte y empalme alternativo. Un gran número de isoformas son causadas por polimorfismos de un nucleótido, en los alelos de un mismo gen. El descubrimiento de las isoformas explica aparentemente el pequeño número de genes codificantes que fueron encontrados por el Proyecto Genoma Humano; la capacidad de crear proteínas catalíticamente diferentes partiendo de un mismo gen aumenta la diversidad del proteoma⁶⁹.

Dentro del exón 16 del gen en estudio, se encuentra un sitio aceptor de corte y empalme alternativo en la secuencia 3' que permite la inserción de 159 pb; de tal manera que como resultado de este procesamiento, se pueden expresar dos isoformas: una de 454 pb. (forma silvestre) y una de 613 pb. (forma mutada)⁵⁸(Figura 7). Estas isoformas cobran vital importancia ya que se han encontrado en distintos tipos de cáncer tales como colon, esófago, en células hela⁷⁰ y tumor de Wilms⁵⁹.

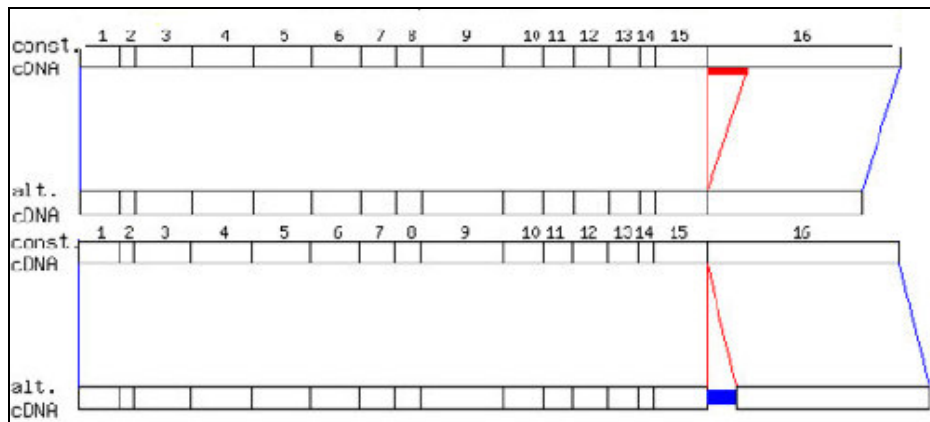


Figura 7.- Ejemplificación de los 16 exones y el sitio aceptor donde se encuentra el “splicing” (corte y empalme alternativo +159 pb.)⁷¹.

ANTECEDENTES

Desde hace muchos años el estudio sobre el cáncer de mama ha venido a tomar gran importancia ya que es una de las principales neoplasias que afectan a las mujeres y con la tendencia que ha adquirido, se ha convertido en el cáncer más frecuente en la población femenina, por lo que se han tomado distintos caminos para investigar este complejo cáncer. Uno de ellos es el abordaje de la biología molecular, llevándonos a estudiar diferentes genes y sus posibles implicaciones en este cáncer. Con respecto a ello, Morin PJ⁷² y colaboradores en 1997 investigaron la inactivación del gen supresor tumoral de pólipos adenomatosos de colon (APC). Una de las actividades relacionadas con la bioquímica de la proteína APC es baja regulación transcripcional de activación mediada por la beta catenina y el factor de transcripción de células T 4 (Tcf-4). La proteína mutante de los productos de los genes APC presentes en los tumores colorectales se encontraron deficientes en su actividad. Estos resultados indican que la regulación de la beta catenina es fundamental para el efecto supresor del tumor (APC), y que esta regulación puede ser modificada por mutaciones en APC o en beta catenina. Mientras que en el 2007 Zhang Yun-gang⁷³ y colaboradores observaron la sobreexpresión de E-caderina, beta catenina, catepsina D, gelatinasas y sus inhibidores en un carcinoma ductal invasivo de seno.

En 1994 Connie Sommers⁷⁴ y su equipo de trabajo investigaron las alteraciones en la fosforilación de beta catenina y la expresión de plakoglobina en células humanas de cáncer de seno, ya que la adhesión caderinas-cateninas de células epiteliales está ausente en muchos carcinomas invasivos. En el 2007 Liu Zhen⁷⁵ y sus colaboradores encontraron que la inactivación del gen (APC) da una disfunción en la degradación de beta catenina, lo que activa a los factores Tcf/Lef y conduce a la transcripción de oncogenes como *c-myc*, *c-jun* y *ciclina D1* lo que permite la carcinogénesis.

En el 2003 Christine Gilles⁷⁶ y su equipo mostraron que la redistribución citoplasmática y nuclear de beta catenina y la expresión *de novo* de vimentina está frecuentemente envuelta en la transición de epitelio/mesenquima asociado con el incremento invasivo/migratorio de las propiedades de las células epiteliales.

Heike Pospisil⁷¹, y sus colaboradores en el 2006 demostraron que el corte y empalme alternativo puede jugar un papel de mayor importancia en la carcinogénesis y en la

progresión tumoral y que la ruta Wnt es de crucial relevancia en la progresión del cáncer; valiéndose de métodos bioinformáticos validaron la expresión de secuencias con corte y empalme alternativo predichas para que así puedan tener un probable potencial y poder actuar como marcadores biológicos.

En 1995 Friedel Nollet¹³ y colaboradores dieron una exhaustiva y completa descripción del gen beta catenina (*CTNNB1*) en su trabajo, determinando la estructura primaria del gen mediante el análisis de clonas genómicas de cDNA. También informaron el tamaño completo del gen y realizaron un mapeo y un análisis secuencial revelando los 16 exones. Realizaron un análisis exón por exón para determinar la longitud de cada uno de ellos, y los comparan con una publicación previa¹¹ de una secuencia de mRNA e identifican el sitio aceptor del empalme alternativo en el exón 16 de la región reducida 3'-UTR donde se observan los 159 pb que pueden estar relacionados a diferentes tipos de tumores humanos y/o diversas patologías y a mutaciones relevantes por la inactivación de beta catenina (*CTNNB1*).

HIPOTESIS

Las isoformas A y B del gen beta catenina se expresan de manera diferente en el tejido con cáncer de mama con respecto al tejido adyacente al tumor.

HIPOTESIS NULA

Las isoformas A y B del gen beta catenina no se expresan de manera diferente en el tejido con cáncer de mama con respecto al tejido adyacente al tumor.

OBJETIVOS

◆ **General.-** Analizar la expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en cáncer de mama.

◆ **Particulares.-**

1. Obtener el RNA de las muestras a analizar.
2. Estandarizar las condiciones óptimas para la síntesis de cDNA y para la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
3. Secuenciar los fragmentos amplificados por PCR para comprobar que se trata de los transcritos de beta catenina.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Los tumores fueron obtenidos del Hospital de oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; Estas muestras se emplearon también para llevar a cabo otros estudios⁷⁷. A continuación se muestran las características de las muestras analizadas (Tablas 2 y 3).

TEJIDO AFECTADO

Tabla 1.- Relación de las muestras de tejido afectado de pacientes analizados

Muestras	Edad	Diagnóstico	Quimio
1.- M 18A	52	Ca mama derecha EC II B	19-dic-06
2.- M 19A	65	Ca mama derecha EC II A T2N0MO	
3.- M 20A	67	Ca mama izquierda EC II B T2N0MO	31-mayo-07
4.- M 22A	60	Ca mama derecha EC II A T2N0MO	
5.- M 21A	70	Ca mama izquierda EC III C T2N3MO	

Ca.- cáncer, EC.- estadio del carcinoma

*Nomenclatura de estadios mamarios ver ANEXO II

TEJIDO SANO ADYACENTE

Tabla 2.- Relación de las muestras de tejido adyacente sano de pacientes analizados

Muestras	Edad	Diagnóstico
6.- M 18S	52	Tejido sano adyacente
7.- M 19S	65	Tejido sano adyacente
8.- M 20S	67	Tejido sano adyacente
9.- M 22S	60	Tejido sano adyacente

Extracción de RNA

El procedimiento que se llevó a cabo para extraer el RNA de tejido proveniente de un tumor fue el siguiente: se realizó primero su congelación en nitrógeno líquido en un tubo Falcon (50 ml), una vez que se realizó este paso se procedió a seguir el protocolo de extracción de RNA mediante el kit comercial *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Figura 8).

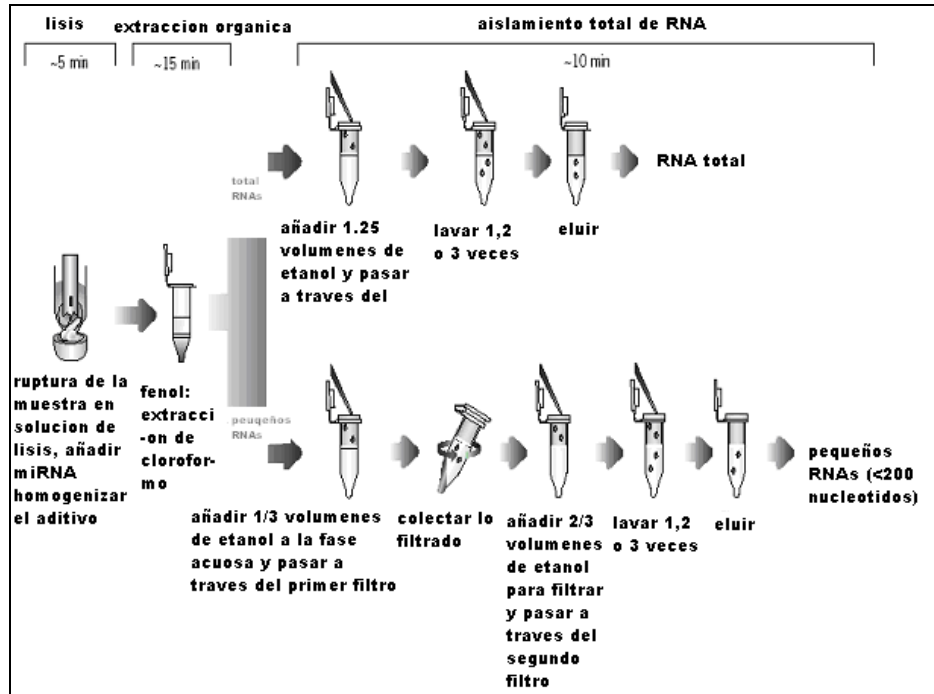


Figura 1.- Diagrama de extracción de RNA.

Se realizó el análisis cualitativo y la comprobación de la presencia de RNA en las muestras procesadas mediante una electrofóresis en gel de agarosa al 2%, revelado con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml.

Se cuantificó el RNA de las muestras tomando la lectura en el espectrofotómetro (ependorf biophotometer) a una longitud de onda de 260nm; tomando 1µl de la muestra y 49 µl de agua inyectable para obtener una dilución 1:50. Para calcular el grado de pureza se tomó en cuenta la relación A_{260} / A_{280} .

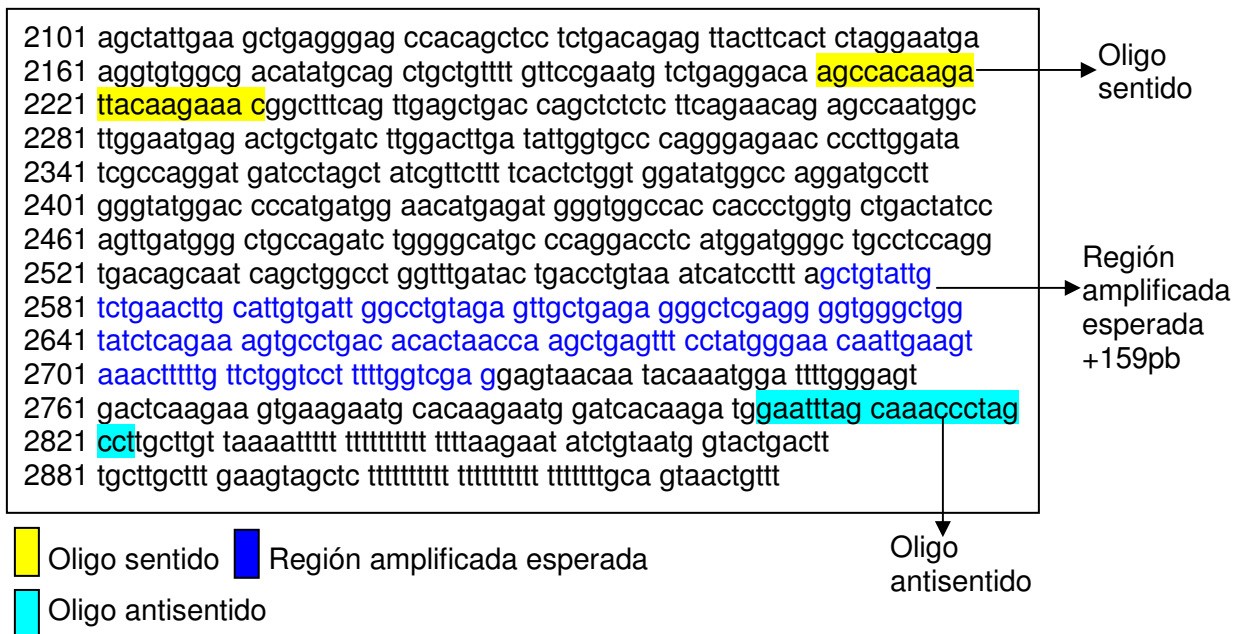
Transcripción Reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR)

Se obtuvo el cDNA a partir de RNA total, mediante la reacción de transcriptasa reversa.

Con el fin de estandarizar las técnicas el gen que se utilizó hasta que se logró el cometido fue el gen constitutivo hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) utilizando los siguientes oligonucleotidos: hprt1 5'-CGT GGC GTC CTT TTC ACG AGC AAG-3' y hprt2 5'-AAT TAT GGA CAG GAC TGA ACG TC-3'.

Para amplificar la región de interés de beta catenina se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleotidos⁵⁹, 13Fbetacat5'-AGC CAC AAG ATT ACA AGA AAC -3' y 16Rbetacat5'-AGG CTA GGG TTT GCT AAA TTC-3'. La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 95°C, durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto de amplificación por PCR incluyó del exón 13 al 16 para evaluar la expresión del RNAm de beta catenina y de sus isoformas.

Oligonucleotidos	Secuencia 5' a 3'	longitud	exón	observaciones
BCAT13F	AGCCACAAGATTACAAGAAAC	21	13	de la 2211pb a 2231 pb
BCAT16R	AGGCTAGGGTTTGCTAAATTC	21	16	de la 2803pb a 2823 pb



Los fragmentos amplificados se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5%. Los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml y se mantuvieron durante 60 minutos a 52 Volts. Se empleó un marcador de peso molecular de 1kb (DNA ladder Gibco®). Se observaron los productos amplificados en un transluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD)

Purificación de los productos de PCR

Una vez que se visualizaron las bandas obtenidas mediante la reacción de PCR y al observarlas y ver que efectivamente correspondían al tamaño que se esperaba, se procedió a la purificación para su posterior secuenciación y así comprobar que efectivamente era la región de interés la que se estaba amplificando.

La purificación se realizó cortando las bandas que se observaron en el gel de agarosa, para después realizar la purificación mediante el Kit de Purificación de Electroforesis (Marligen) (Figura 9).

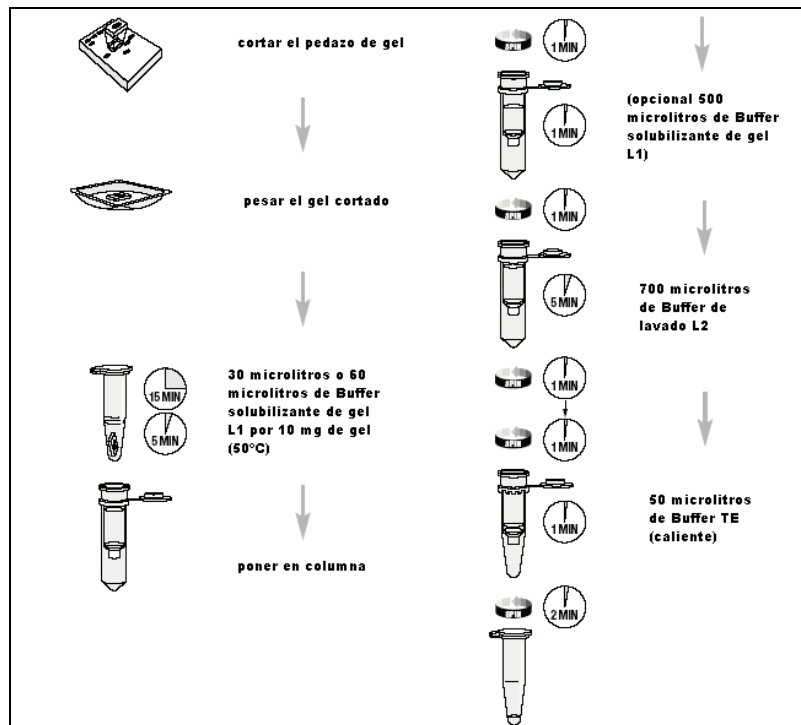


Figura 2.- Diagrama de la purificación de productos de PCR

Marcado y Secuenciación de los productos amplificados por PCR

Para el marcado se utilizó el método de BIG DYE “Terminator fluorescence based sequencing”, que consiste en lo siguiente:

Se realizó una segunda PCR general llamada “PCR de secuencia”. En ella sólo se añadió un oligonucleotido en lugar de dos. En este caso se añaden dNTP's diferentes, ya que son una mezcla de dNTP's normales y ddNTP's marcados con fluorocromos. Así, la DNAPolimerasa irá incorporando dNTP's a las cadenas amplificadas hasta que se añada un ddNTP's que, como no dispone de un extremo OH 3', impide que la polimerasa continúe añadiendo más nucleótidos. De esta forma, se obtiene un conjunto de cadenas que terminan en un ddNTP's marcado con una molécula fluorescente, el cual al ser leído por el secuenciador va a indicar a éste de que base se trata.

Como ya se mencionó con la finalidad de corroborar que los productos amplificados fueran las isoformas A y B del gen beta catenina, se realizó la secuenciación de cada uno de los productos amplificados.

Al terminar la PCR de secuencia se precipitó la muestra para eliminar restos de reactivos y ddNTP's marcados para que no interfieran en la posterior lectura. Las muestras se prepararon para ser analizadas en un secuenciador automático. Para ello, se resuspendieron en un amortiguador específico (recomendado por el proveedor que distribuye el secuenciador automático). Después se pasaron al secuenciador.

En el secuenciador se realizó una electroforesis capilar de manera que es capaz de separar las cadenas de DNA obtenidas en la PCR de secuencia que se diferencian en una sola base. El láser va leyendo la secuencia según la longitud de onda que van emitiendo los fluorocromos, asociando cada longitud de onda a una determinada base nitrogenada.

Análisis mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Después de haber obtenido el resultado de la secuenciación se hizo una búsqueda bioinformática en la base de datos BLAST, para comparar la secuencia con las que se encuentren en la base de datos y ver con cual presenta mayor homología, y así tener datos más exactos.

RESULTADOS

Como se mencionó en materiales y métodos, las muestras empleadas en este trabajo también sirvieron para un proyecto sobre micro RNA's, el RNA se obtuvo con el kit *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion, Inc., Applied Biosystems) obteniéndose buena calidad como se puede apreciar en la siguiente figura:

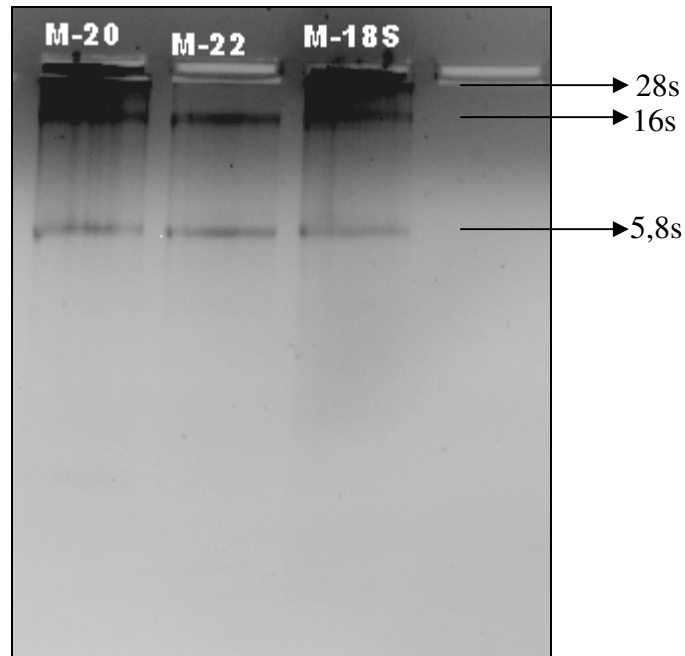


Figura 1.- Gel de agarosa al 2% para el análisis cualitativo de RNA donde se observa la calidad y cantidad de 3 muestras, M-20 afectada, M-22 afectada y M-18S tejido adyacente sano

Después de la extracción se procedió a la cuantificación del RNA mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm empleando la siguiente formula: $40\mu\text{g} \times \mu\text{l} + A_{260}$. En donde $40\mu\text{g}$ = a una unidad de ssRNA, μl = microlitros totales de la solución, A_{260} = concentración de la muestra de RNA.

TEJIDO TUMORAL Y TEJIDO ADYACENTE SANO

Tabla 1.-Concentraciones de RNA obtenidas de las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente sano

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN
1.- M-18A	280 ng/ μ l
2.- M-19A	332 ng/ μ l
3.- M-20A	558 ng/ μ l
4.- M-22A	174 ng/ μ l
5.- M-21A	564 ng/ μ l
MUESTRAS	CONCENTRACION
6.- M-18S	325 ng/ μ l
7.- M-19S	90 ng/ μ l
8.- M-20S	345 ng/ μ l
9.- M-22S	427 ng/ μ l

RT – PCR

Como ya se indicó en materiales y métodos, se amplificaron regiones específicas del gen en estudio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los cuales se obtuvieron 2 bandas, una de 454 pb y otra de 613 pb en 4 muestras de tejido tumoral (M-18A, M-19A, M-21A Y M-22A). En la muestra M-22A de tejido tumoral se obtuvo una banda de alrededor de 300 pb misma que no corresponden a ninguna de las isoformas descritas por lo que puede tratarse de algún producto inespecífico o bien pudo deberse a la falta de integridad del RNA total.

Respecto al tejido adyacente sano en una muestra (M-22S) se observó claramente la banda de 454 pb, en dos muestras (M-19S y M-20S) se observó la banda de 454 pb y otras dos bandas más una de 613 y una de aproximadamente 700 pb y en una última muestra (M-18S) se observó la banda de 454 pb y dos bandas más una de aproximadamente 100 pb y una de alrededor de 300 pb mismas que no corresponde a ninguna de las isoformas descritas por lo que puede tratarse de algún producto inespecífico.

Estos resultados se pueden observar en las siguientes tablas:

TEJIDO TUMORAL

Tabla 2.- Expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en tejido tumoral.

MUESTRA	PRESENCIA O AUSENCIA DE ISOFORMAS		
	B	A	
1.- M-18A	454 pb	613 pb	
2.- M-19A	454 pb	613 pb	
3.- M-20A	—————	—————	
4.- M-22A	454 pb	613 pb	Aprox. 300 pb
5.- M-21A	454 pb	613 pb	

TEJIDO SANO ADYACENTE

Tabla 3.- Expresión de las isoformas A y B del gen beta catenina en tejido adyacente sano.

MUESTRA	PRESENCIA O AUSENCIA DE ISOFORMAS		
	B	A	
6.- M-18S	454 pb	Aprox.300 pb	Aprox. 100 pb
7.- M-19S	454 pb	613 pb	Aprox. 700 pb
8.- M-20S	454 pb	613 pb	Aprox. 700 pb
9.- M-22S	454 pb		

A continuación se muestran las figuras 11–15 con los resultados obtenidos:

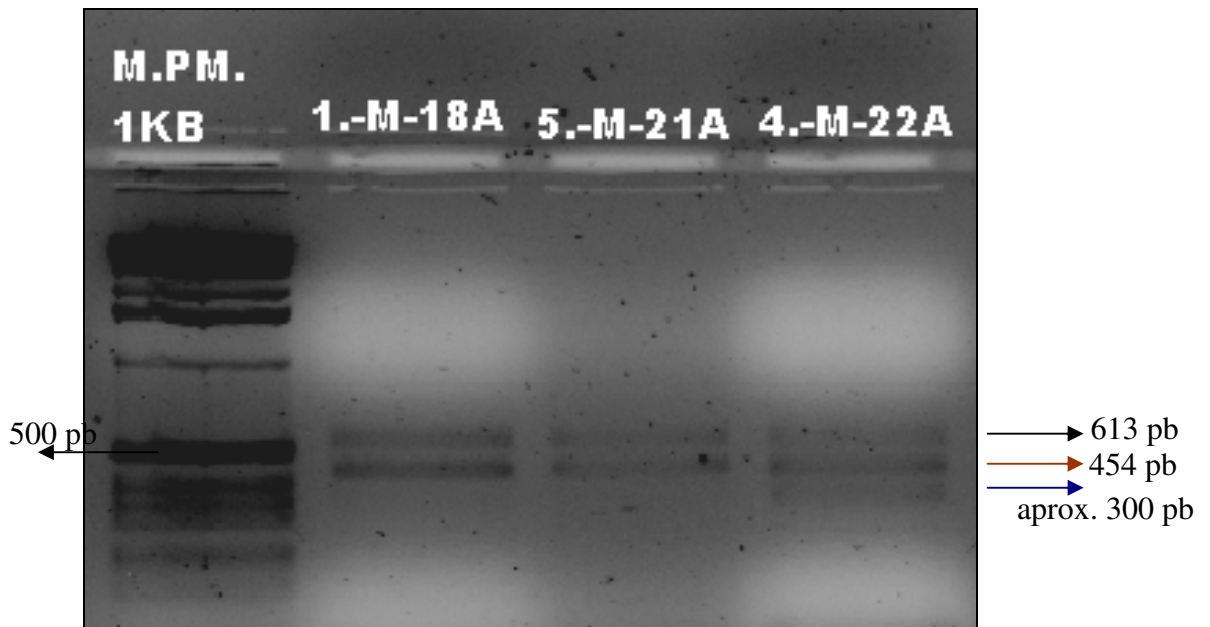


Figura 2.- Muestras 1, 5 y 4 de tejido tumoral , M.P.M.= marcador de peso molecular. A.- afectada, S.- sana.

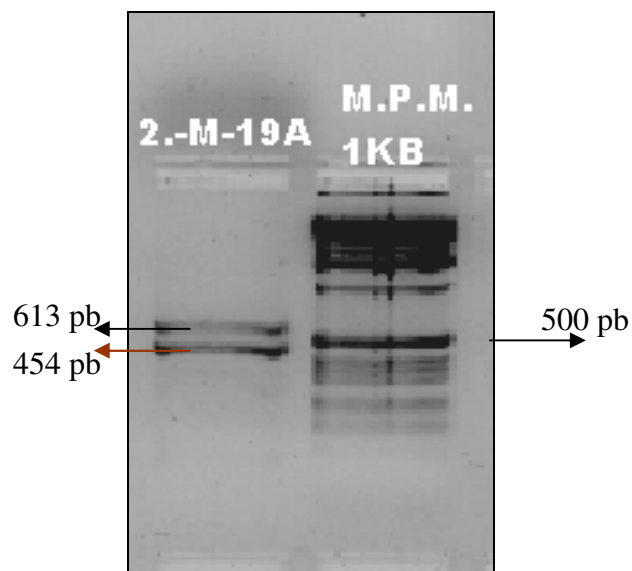


Figura 3.- Muestra 2 de tejido tumoral, A.- afectada.

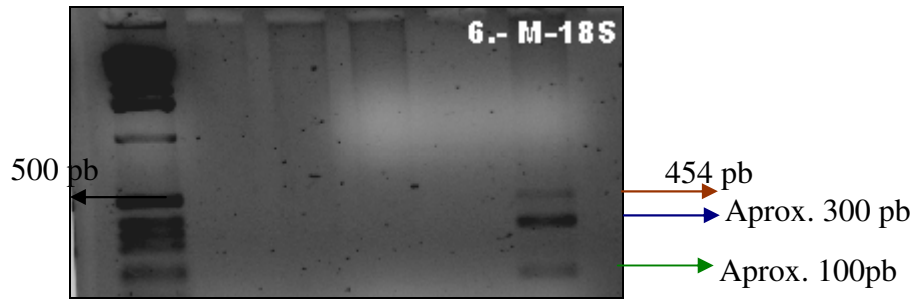


Figura 4.- Muestra 6 de tejido adyacente sano, S.- sana.

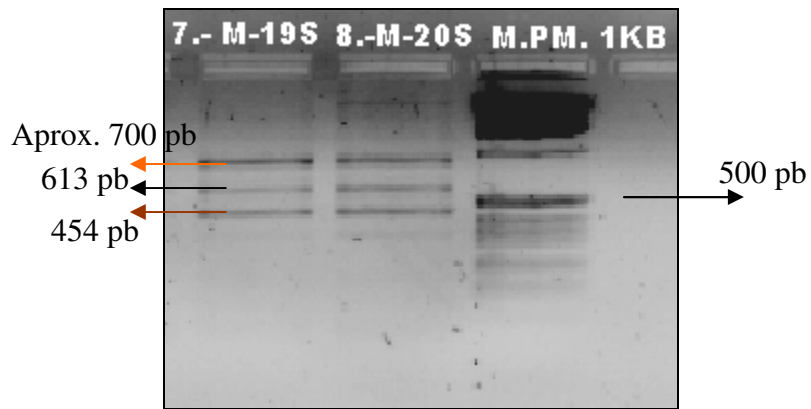


Figura 5.- Muestras 7 y 8 de tejido adyacente sano, S.- sana.

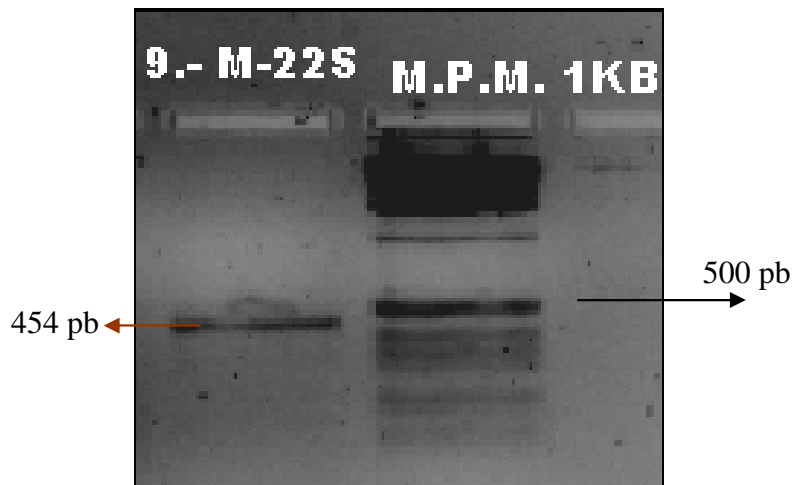


Figura 6.- Muestra 9 de tejido adyacente sano, S.- sana.

Como se puede observar en las figuras 11 a 15, la expresión del fragmento de 454 pb (-159 pb, isoforma B) se presentó en todas las muestras analizadas incluyendo el tejido tumoral, lo cual indica que la forma silvestre permanece en estos tejidos a pesar de tratarse de células neoplásicas.

Mientras tanto el fragmento de 613 pb (+159 pb, isoforma A) se expresó en tejido tumoral, esto se puede observar en las figuras 11 y 12, y puede indicar que estos +159 pb podrían ser importantes a nivel de transcritos de proteína para alguna de las etapas: desarrollo, progresión y/o metástasis de las células malignas; también puede ser que se trate de una región reguladora. Sin embargo al compararla en los tres niveles de organización (DNA, RNA, Proteína) no se encontraron secuencias homólogas relevantes.

Cabe mencionar que la banda de alrededor de 300 pb que se observó en tejido tumoral puede tratarse de una variante de empalme alternativo ya que además , esta banda también se encontró en la muestra número 6 de tejido adyacente sano.

En las muestras número 7 y 8 que corresponden a tejido adyacente sano se expresó la isoforma B (-159 pb), pero además se expresó la isoforma A (+159 pb) esto nos puede indicar que en estas muestras de tejido adyacente sano a nivel macroscópico puede mostrarse como sano, pero a nivel microscópico pudo haberse dado una migración de células malignas lo cual nos estaría dando la aparición de la isoforma A, cabe mencionar que en estas dos muestras (7 y 8) se encontró una banda más de alrededor 700 pb, lo cual nos podría indicar que se esta dando lugar a otros mecanismos en los cuales nos podría dar la aparición de una isoforma más o de algún producto inespecífico, esto puede observarse en la figura 14.

En la muestra número 9 de tejido adyacente sano sólo se presentó la isoforma B (-159 pb), obteniéndose el resultado que buscábamos por lo que podríamos decir que este tejido se encontraba sano por lo tanto sólo se expresó esta isoforma B (-159 pb).

Como se ha venido mencionando para corroborar que la aparición de las bandas de 454 pb y de 613 pb fueran las que en verdad se esperaban se llevó a cabo la secuenciación, cuyo electroferograma se muestran en la figura 16.

RESULTADO DE LA SECUENCIA DE LA BANDA DE 613 pb.



Figura 7.- Electroferograma de la secuencia del amplificado del gen beta catenina, isoforma

A.

Después de haberse obtenido el electroferograma se consultó la base de datos bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obteniéndose el resultado que se muestra en las figuras 17 y 18 a continuación. Se observó un porcentaje de homología del 99% de la secuencia obtenida de la muestra analizada, respecto a la secuencia informada en el GenBank para mRNA de beta catenina.

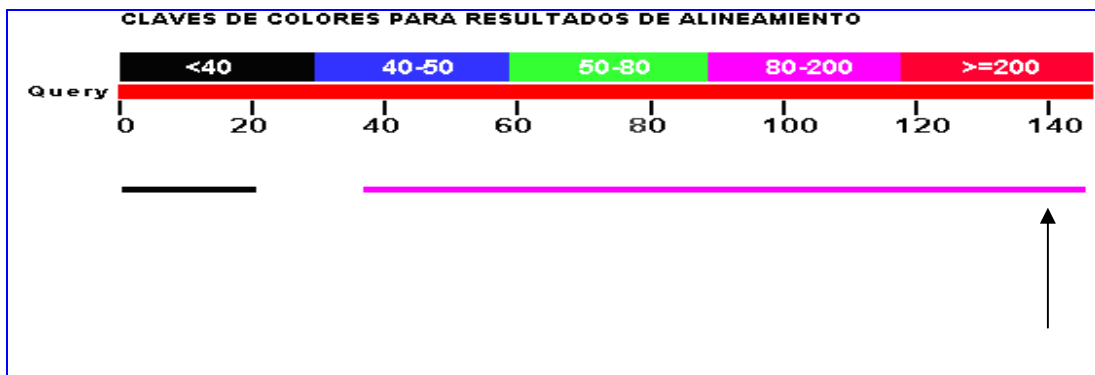


Figura 8.- Resultados del alineamiento con el programa BLAST, flecha indica la secuencia encontrada

```

Score = 190 bits (210), Expect = 3e-46
Identities = 107/108 (99%), Gaps = 0/108 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 38  AGGAGTAACAATACAAATGGATTTTGGGAGTGACTCAAGAAGTGAAGAATGCACAAGAAT 97
          |||
Sbjct 2625 AGGAGTAACAATACAAATGGATTTTGGGAGTGACTCAAGAAGTGAAGAATGCACAAGAAT 2684

Query 98  GGATCACAAGATGGAATTTATCAAACCCTAGCCTTGCTTGTTAAAATT 145
          |||
Sbjct 2685 GGATCACAAGATGGAATTTATCAAACCCTAGCCTTGCTTGTTAAAATT 2732
    
```

Figura 9.- Secuencia con mayor homología (99%) encontrada en la base de datos del BLAST

Beta catenina es un gen conservado, como se muestra en la figura 19, por lo que se espera que la proteína también se encuentre conservada debido a sus funciones primordiales para los organismos, como ya se mencionó en la introducción.

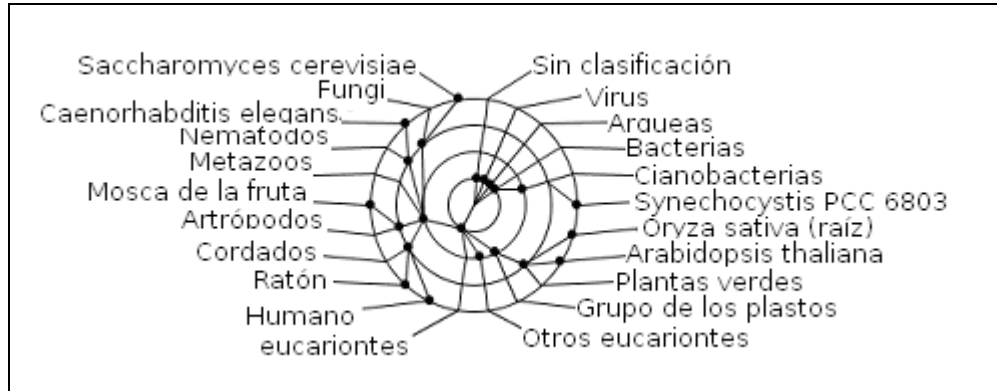


Figura 10.- Organismos en donde se encuentra el gen beta catenina⁷⁸.

En la siguiente figura se puede observar el exón 16 que es donde se encuentra el sitio de “splicing” (corte y empalme alternativo) :

			2575	gtattg		
2581	tctgaacttg	cattgtgatt	ggcctgtaga	ggtgctgaga	gggctcgagg	ggtgggctgg
2641	tatctcagaa	agtgctgac	acactaacca	agctgagttt	cctatgggaa	caattgaagt
2701	aaacttttg	ttctggctct	tttggtcga	ggagtaacaa	tacaaatgga	tttgggagt
2761	gactcaagaa	gtgaagaatg	cacaagaatg	gatacaaga	tggaatttag	caaaccctag
2821	cctgctgt	taaaatfff	tttttttt	tttaagaat	atctgtaatg	gtactgactt
2881	tgctgcttt	gaagtagctc	tttttttt	tttttttt	ttttttgca	gtaactgttt
2941	tttaagtctc	tcgtagtgtt	aagttatagt	gaatactgct	acagcaattt	ctaatttta
3001	agaattgagt	aatggtgtag	aacactaatt	aattcataat	cactctaatt	aattgtaatc
3061	tgaataaagt	gtaacaattg	tgtagccttt	ttgtataaaa	tagacaaata	gaaaatggtc
3121	caattagttt	ccttttaat	atgcttaaaa	taagcagggtg	gatctatttc	atgttttga
3181	tcaaaaacta	tttgggat	gtatgggtag	ggtaaatcag	taagagggtg	tatttggaac
3241	cttgtttgg	acagtttacc	agttgccttt	tatcccaaag	ttgttgaac	ctgctgtgat
3301	acgatgcttc	aagagaaaat	gcggtataa	aaaatggttc	agaattaaac	tttaattca
			3361	tt		

Figura 20.- Exon 16, bordes azules marcan la parte A (+159 pb) del exón.

En la figura 21 se puede observar la diferencia de la longitud de los exones cuando se encuentra el “splicing” (corte y empalme) y cuando este no está presente.

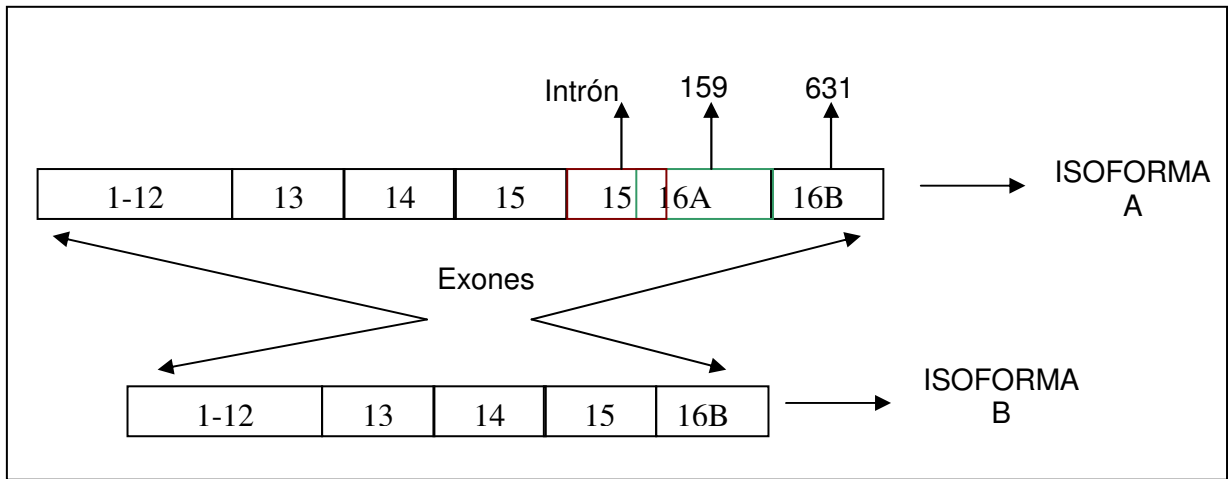


Figura 21.- Diferencias de longitud de los 16 exones del gen beta catenina.

DISCUSIÓN

La disponibilidad de la secuencia del genoma humano nos permite identificar aquellas partes que pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. Existen genes importantes en el cáncer que presentan corte y empalme alternativo, lo que genera diferentes isoformas que cobran importancia en los estados celulares patológicos como el cáncer.

Algunos informes muestran ejemplos en donde dos o más variantes del mismo gen pueden jugar papeles diferentes, específicamente en la transformación neoplásica. Un ejemplo de ello es la expresión de la isoforma de *HER2* 100 kDa que codifica para un dominio extracelular de *HER2* (HER-ECD) que inhibe el crecimiento de las células tumorales en proliferación, lo que se contrapone a la actividad oncogénica conocida de *HER2*⁵⁹.

Cabe mencionar que son varios los genes involucrados en el desarrollo del cáncer, considerando que estos pueden presentar más de una isoforma, se complica el proceso de transformación maligna. Debido a lo anterior, se hace necesario el análisis de la participación de las isoformas de genes críticos en alguna de las etapas del cáncer.

En esta tesis se planteó el objetivo de observar la expresión diferencial de las isoformas A y B (+/- 159) del gen beta catenina en cáncer de mama con respecto a tejido sano adyacente.

Los resultados observados indican la presencia de la isoforma A y B (+/- 159 pb) en todas las muestras de tejido tumoral; mientras que en el tejido adyacente sano se expresó la isoforma B (-159 pb) en dos muestras. Sin embargo, en otras dos muestras se expresaron ambas como ocurrió en el tejido tumoral. Esto se pudo haber presentado por inclusión de células neoplásicas a este tejido y dada la eficiencia y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa se obtuvieron ambas isoformas, sin embargo, a pesar de no haberse hecho una cuantificación, la intensidad de ambas bandas fue semejante. Aunque las células eran morfológicamente sanas, al ser tejido adyacente, este ya se encontraría

comprometido con la neoplasia y por lo tanto, estas podrían tener a beta catenina alterada, presentando la isoforma A (+ 159).

Estos resultados son coincidentes con un estudio previo que se realizó en tumor de Wilms, colon y próstata el cual también tiene un componente epitelial como el cáncer de mama; en dicho estudio se observó la expresión de las isoformas A y B (+/- 159 pb) del gen beta catenina, este gen al formar parte del complejo de adhesión de células epiteliales es un integrante crucial del mismo y en el proceso de transcripción de genes. Beta catenina tiene dos destinos: ser ubiquitinizada y destruida o quedar libre y entrar al núcleo y tomar el papel de activador de ciertos genes muchos de los cuales están involucrados en la supervivencia y en la proliferación celular, estos procesos están interconectados con otros mecanismos resultantes de estas alteraciones que pueden dar una causa hacia el cáncer⁷⁹.

Cabe mencionar que beta catenina no es el único gen involucrado en el desarrollo de cáncer de mama y además no solamente esta alterada en este tipo de tumor sino también en otros tipos como son, cáncer de colon, próstata y otros; se tiene muy poco informado sobre la participación de las isoformas A y B (+/- 159 pb) del gen beta catenina, por lo cual este trabajo podría ser una contribución para este tipo de estudios y también podría dar un aporte en la búsqueda de marcadores tumorales en este caso en cáncer de mama.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos muestran la expresión diferencial de las isoformas A y B (+/- 159 pb) del gen beta catenina en cáncer de mama con respecto a tejido adyacente sano.
- Se observó la presencia de la isoforma A (+159 pb) en tejido tumoral.
- La isoforma B (-159 pb) o sea la forma silvestre se expresa tanto en las muestras de tejido afectado como en las muestras de tejido sano adyacente.
- La isoforma A (+159 pb) del gen beta catenina en cáncer de mama podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta neoplasia.
- Se recomienda hacer un estudio posterior analizando muestras tumorales y tejido sano, para corroborar que la isoforma A es específica de tejido tumoral y la B de tejido sano.

ANEXO I

SECUENCIA DE mRNA DEL GEN BETA CATENINA (número de acceso X89578–X89593, X87838, y X89448, GenBank Data Libraries).

```
1  aagcctctcg  gtctgtggca  gcagcgttgg  cccggccccg  ggagcggaga  gcgaggggag
61  gcgagacgg  aggaaggctt  gaggagcagc  ttcagtcccc  gccgagccgc  caccgcaggt
121  cgaggacgg  cggactcccc  cggcggggagg  agcctgttcc  cctgagggta  tttgaagtat
181  accatacaac  tgtttgaaa  atccagcgtg  gacaatggct  actcaagctg  atttgatgga
241  gttggacatg  gccatggaac  cagacagaaa  agcggcgtgt  agtcaactgg  agcaacagtc
301  ttacctggac  tctggaatcc  attctgtgtc  cactaccaca  gtcctctc  tgagtggtaa
361  aggcaatcct  gaggaagagg  atgttgatac  ctccaagtc  ctgtatgagt  gggaacaggg
421  atttctcag  tcctcactc  aagaacaagt  agctgatatt  gatggacagt  atgcaatgac
481  tcgagctcag  aggtacgag  ctgctatgtt  ccctgagaca  ttagatgagg  gcatgcagat
541  cccatctaca  cagtttgatg  ctgctatcc  cactaatgtc  cagcgtttgg  ctgaaccatc
601  acagatgctg  aaacatgcag  ttgtaaactt  gattaactat  caagatgatg  cagaactgac
661  cacacgtgca  atccctgaac  tgacaaaact  gctaaatgac  gaggaccagg  tggtggttaa
721  taaggctgca  gttatggctc  atcagcttc  taaaaaggaa  gctccagac  acgctatcat
781  gcgttctcct  cagatgggtg  ctgctattgt  acgtaccatg  cagaatacaa  atgatgtaga
841  aacagctcgt  tgtaccgctg  ggacctgca  taacctttcc  catcatcgtg  agggcttact
901  ggccatcttt  aagtctggag  gcattcctgc  cctggtgaaa  atgcttggtt  caccagtgga
961  ttctgtgttg  tttatgcca  ttacaactct  ccacaacctt  ttattacatc  aagaaggagc
1021  taaaatggca  gtgcgtttag  ctggtgggct  gcagaaaatg  gttgccttgc  tcaacaaaac
1081  aaatgtataa  ttctggcta  ttacgacaga  ctgcctcaa  attttagctt  atggcaacca
1141  agaaagcaag  ctcatcatac  tggctagtgg  tggaccccaa  gctttagtaa  atataatgag
1201  gacctatact  tacgaaaaac  tactgtggac  cacaagcaga  gtgctgaagg  tgctatctgt
1261  ctgctctagt  aataagccgg  ctattgtaga  agctggtgga  atgcaagctt  taggacttca
1321  cctgacagat  ccaagtcaac  gtctgttca  gaactgtctt  tggacttca  ggaatctttc
1381  agatgctgca  actaaacagg  aagggatgga  aggtctcctt  gggactcttg  ttcagcttct
1441  gggttcagat  gatataaatg  tggtcacctg  tgcagctgga  attcttcta  acctcacttg
1501  caataattat  aagaacaaga  tgatggctctg  ccaagtgggt  ggtatagagg  ctctgtgctg
1561  tactgtcctt  cgggctggtg  acaggggaaga  catcactgag  cctgccatct  gtgctctcag
1621  tcacttgacc  agccgacacc  aagaagcaga  gatggcccag  aatgcagttc  gccttactca
1681  tggactacca  gttgtggta  agctcttaca  cccaccatcc  cactggcctc  tgataaaggc
1741  tactgttggg  ttgattcgaa  atcttgcctt  ttgtcccgca  aatcatgcac  ctttgcgtga
1801  gcaggggtgcc  attccacgac  tagttcagtt  gcttgttctg  gcacatcagg  ataccagcgg
1861  ccgtacgtcc  atgggtggga  cacagcagca  atttgtggag  ggggtccgca  tggagaagaat
1921  agttgaaggt  tgtaccggag  ccctcacat  cctagctcgg  gatgttca  accgaattgt
```

1981	tatcagagga	ctaaatacca	ttccattggt	tgtgcagctg	ctttattctc	ccattgaaaa
2041	catccaaaga	gtagctgcag	gggtcctctg	tgaacttgct	caggacaagg	aagctgcaga
2101	agctattgaa	gctgagggag	ccacagctcc	tctgacagag	ttacttcaact	ctaggaatga
2161	aggtgtggcg	acatatgcag	ctgctgtttt	gttcggaatg	tctgaggaca	agccacaaga
2221	ttacaagaaa	cggcttcag	ttgagctgac	cagctctctc	ttcagaacag	agccaatggc
2281	ttggaatgag	actgctgac	ttggactga	tattggtgcc	cagggagaac	cccttgata
2341	tcgccaggat	gatctagct	atcgctctt	tcactctggt	ggatatggcc	aggatgcctt
2401	gggtatggac	cccatgatgg	aacatgagat	gggtggccac	cacctgggtg	ctgactatcc
2461	agttgatggg	ctgccagatc	tggggcatgc	ccaggacctc	atggatgggc	tgcctccagg
2521	tgacagcaat	cagctggcct	ggtttgatac	tgacctgtaa	atcatcctt	agctgtattg
2581	tctgaactg	cattgtgatt	ggcctgtaga	gttgctgaga	gggctcgagg	ggtgggctgg
2641	tatctagaa	agtgcctgac	acactaacca	agctgagttt	cctatgggaa	caattgaagt
2701	aaacttttg	ttctggctct	tttggctga	ggagtaacaa	tacaaatgga	ttttggagt
2761	gactcaagaa	gtgaagaatg	cacaagaatg	gatacaaga	tggaattag	caaaccctag
2821	ccttgctgt	taaaaat	ttttttt	tttaagaat	atctgtaatg	gtactgactt
2881	tgcttgctt	gaagtagctc	ttttttt	ttttttt	tttttgca	gtaactgttt
2941	ttaagtctc	tcgtagtgtt	aagttatagt	gaatactgct	acagcaattt	ctaatttta
3001	agaattgagt	aatggtgtag	aacactaatt	aattcataat	cactctaatt	aattgtaatc
3061	tgaataaagt	gtaacaattg	tgtagcctt	ttgtataaaa	tagacaaata	gaaaatggtc
3121	caattagttt	ccttttaat	atgcttaaaa	taagcaggtg	gatctatttc	atgttttga
3181	tcaaaaacta	tttgggat	gtatgggtag	ggtaaatacag	taagagggtg	tatttggaac
3241	ctgttttgg	acagttacc	agttgcctt	tatcccaag	ttgttgaac	ctgctgtgat
3301	acgatgctc	aagagaaaat	gcgggtataa	aaaatgggtc	agaattaaac	tttaattca
3361	tt					

ANEXO II

Nomenclatura de estadios mamarios:

TUMOR (T):
TX: No existen datos sobre tumor primario.
Tis: Carcinoma in situ. Carcinoma intraductal o lobular in situ, enfermedad de Paget sin tumor objetivable.
T0: Tumor no palpable.
T1: Tumor hasta 2 cm. en su máxima extensión, aunque invada el pectoral mayor.
T2: Tumor entre 2-5 cm. en su máxima extensión, aunque invada el pectoral mayor.
T3: Tumor de más de 5 cm. en su máxima dimensión, aunque invada el pectoral mayor.
T4: Tumor de cualquier tamaño, con fijación a la pared costal o piel. (La pared costal incluye: costillas, músculos intercostales y músculo serrato anterior, pero no el músculo pectoral).
T4a: Extensión a pared torácica.
T4b: Edema cutáneo (incluyendo piel de naranja), úlceras cutáneas o nódulos satélites en la propia mama.
T4c: Ambas posibilidades.
T4d: Carcinoma inflamatorio de la mama.
ADENOPATÍAS (N):
N0: Adenopatías axilares no metastásicas.
N1: Adenopatías axilares ipsilaterales metastásicas.
N2: Adenopatías axilares ipsilaterales metastásicas con fijación a la grasa axilar u otras estructuras de la zona.
N3: Metástasis en adenopatías de la cadena mamaria interna ipsilateral.
METASTASIS
M0: Ausencia de metástasis.
M1: Metástasis a distancia más allá de la propia mama y de los ganglios de la axila y cadena mamaria interna.
ESTADIOS
Estadio 0 (carcinoma in situ)
Hay dos tipos de carcinoma de mama in situ:
Carcinoma ductal in situ (CDIS): afección no invasora en la que se encuentran células

anormales en el revestimiento del conducto de la mama. Las células anómalas no se han diseminado fuera de este conducto hasta otros tejidos de la mama. Algunas veces, el CDIS se puede volver cáncer invasor y diseminarse hasta otros tejidos, aunque por el momento no se sabe cómo predecir cuáles lesiones se volverán invasoras.

Carcinoma lobular in situ (CLIS): afección en la que se encuentran células anormales en los lóbulos de la mama. Muy raras veces esta afección se vuelve cáncer invasor; sin embargo, el padecer de carcinoma lobular in situ en una mama aumenta el riesgo de padecer de cáncer de mama en cualquier de las mamas

Estadio I:

El cáncer se ha formado. El tumor mide dos centímetros o menos y no se ha diseminado fuera de la mama.

Estadio IIA:

No hay presencia de tumor en la mama, pero el cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares (los ganglios linfáticos debajo el brazo). El tumor mide dos centímetros o menos y se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares. El tumor mide más de dos centímetros pero no más de cinco centímetros y no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares

Estadio IIB:

El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares; o mide más de cinco centímetros, pero no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares.

Estadio IIIA:

No se encuentra un tumor en la mama. El cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o el tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón; o el tumor mide entre dos centímetros y cinco centímetros. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos de las axilas que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer puede haberse diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón. El tumor mide más de cinco centímetros. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos de las axilas que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer puede haberse diseminado hasta

los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
Estadio IIIB:
El tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer: Se ha diseminado hasta la pared del pecho o a la piel de la mama; y puede haberse diseminado hasta los ganglios linfáticos de las axilas que están unidos entre sí o a otras estructuras o el cáncer puede haberse diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
Estadio IIIC:
<p>Puede no haber signos de cáncer en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño y puede haberse diseminado hasta la pared del pecho o a la piel de la mama. Así mismo, el cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por arriba o debajo de la clavícula; y puede haberse diseminado hasta los ganglios linfáticos de las axilas o hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón. El cáncer que se ha diseminado hasta la piel de la mama se llama cáncer de mama inflamatorio.</p> <p>El cáncer de seno (mama) en estadio IIIC se divide en estadio IIIC operable y estadio IIIC no operable.</p> <p>En el estadio IIIC operable, el cáncer:</p> <ul style="list-style-type: none"> Se encuentra en 10 o más ganglios linfáticos de la axila Se encuentra en los ganglios linfáticos debajo de la clavícula Se encuentra en ganglios linfáticos de la axila y en los ganglios linfáticos cercanos al esternón. <p>En el estadio IIIC no operable del cáncer de seno (mama), el cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por arriba de la clavícula.</p>
Estadio IV:
El cáncer se ha diseminado hasta otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia hasta los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro.

BIBLIOGRAFIA

1. - Bertram J (2001). The molecular biology of cancer. Mol Asp Med 21: 167-223.
2. - Walter & Eliza Hall Institute. (2006) Molecular Genetics of Cancer Division (MGCD) <http://www.wehi.edu.au/research/overview/mgc.html>
3. - <http://www.genome.gov/Pages/Education/AllAbouttheHumanGenomeProject/GuidetoYourGenome07.pdf>
4. - Gariglio, P. (1991) Genética molecular del cáncer. En: Temas selectos de biomedicina 1. Guizar-Vázquez, J. DEMSA. México. 69-111.
5. - CONAPO (2003). Estadísticas de tumores malignos. INEGI, Secretaría de Salud Pública, México. C-11 <http://sinais.salud.gob.mx>
6. - Vogelstein B, Kinzler K, Couch J & Weber L (1998) Breast Cancer. Mc Graw Hill. Chapter 30: 537-550.
7. - Instituto Nacional del Cáncer En: <http://www.nci.nih.gov/espanol>
8. - Bryony S & Werb Z (2002) Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. Science. 296: 1046-1049
9. - Sherman C, Hossfeld D (1992) Cáncer de mama. En: manual de oncología clínica. México. 271-291.
10. - García N. (2006) Análisis de la expresión de las proteínas BIK, Bax; y BCL2 en cáncer de mama en mujeres mexicanas mediante microarreglos de tejido. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Secretaria de investigación y postgrado, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
11. - Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Birchmeier W, Grzeschik K, Ballhausen W (1994) Localization of the human beta catenina gene (CTNNB1) to 3 p21: A region implicated in tumor development. Genomics 23: 272-274.
12. - [e!ensemble Human ContigView En: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?l=3:41215934-41256940](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview?l=3:41215934-41256940)
13. - Nollet F, Geert B, Molemans F, Van Roy F (1996) Genomic Organization of the Human b-Catenin Gene (CTNNB1) Genomics 32: 413-424
14. - Korinek V, Barker N, Willer K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O, Clovers H (1998) Two members of the Tcf family implicated in

Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* 18: 1248-1256.

15. - Valenta T, Lukas J, Korinek V (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucl Acids Res* 31: 2369-2380.

16. - Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996) Binding of GSK3B to the APC-3-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272: 1023-1026

17. - Hart M, de los Santos R, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8: 573-581

18. - Ra Oh R, Park J. Y, Lee S. H, Shin M. S, Kim Y. S, Kim S. Y, Lee H. K, Kim P. J, Oh S. T, Yoo N. J, Lee J. Y (1999) Frequent somatic mutations of the β -catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res.*, 59: 4257-4260

19. - Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T (1999) Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Cancer Res.*, 59: 269-273.

20. - Voeller H. J, Trunica C. I, Gelmann E. P (1998) β -catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 58: 2520-2523.

21. - Milhe A, Carvalho R, Morsink F, Musler A, de Leng W, Ristimaki A (2006) Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. *Mod Pathol* 4: 564-572.

22. - Castaño J (2005) Regulación de la estructura-función de β -catenina y p120-catenina: dos proteínas asociadas a las uniones adherentes. Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Barcelona.

23. - Riggleman B, Wieschaus E and Schedl P (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev*, 3: 96-113.

24. - Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R and Hoschuetzky H (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*, 107: 3655-3663.

25. - Yost C, M Torres, Miller J.R, Huang E, Kimelman D and Moon R.T (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*, 10: 1443-1454.
26. - A Hecht, Litterst C.M, Huber O and Kemler R (1999) Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem*, 274: 18017-18025.
27. - Bauer A, Huber O and Kemler R (1998) Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 14787-14792.
28. - Gallet A, Angelats C, Erkner A, Charroux B, Fasano L and Kerridge S (1999) The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *Embo J*, 18: 2208-2217.
29. - Zorn A.M, Barish G.D, Williams B.O, Lavender P, Klymkowsky M.W and Varmus H.E (1999) Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol Cell*, 4: 487-98.
30. - Nishita M, Hashimoto M.K, Ogata S, Laurent M.N, Ueno N, Shibuya H and Cho K.W (2000) Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*, 403: 781-785.
31. - Takemaru K.I and Moon R.T (2000) The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol*, 149: 249-254.
32. - Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T and Fukamizu A (2000) Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J Biol Chem*, 275: 35170-35176
33. - Behrens J, von Kries J.P, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382: 638-642.
34. - Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S and Polakis P (1995) The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem*, 270: 5549-5555.
35. - Hsu S.C, Galceran J and Grosschedl R (1998) Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol*, 18: 4807-4818.
36. - Mareel M, Berx G, Van Roy F, y Bracke M (1996) The cadherin/catenin complex. A target for antiinvasive therapy *J. Cell Biochem* 61: 524-530.

37. - Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J, von Knebel M (1999) Mutational Activation of the Beta-catenine proto-oncogene is a common event in the development of Wilms tumor. *Cancer Res* 59: 3880–3882.
38. - Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851.
39. - Chen S, Guttridge D.C, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo M.W, Kitajewski J and Wang C.Y (2001) Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol*, 152: 87-96.
40. - Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis A.P, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R and Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111: 241-50.
41. - Behrens J, Jerchow B.A, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D and Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 280: 596-599.
42. - Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G.H, Tan Y, Zhang Z, Lin X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dualkinase mechanism. *Cell*, 108: 837-847.
43. - Zhou B.P and Hung M.C (2005) Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle*, 4: 772-776.
44. - Matsuzawa S.I and Reed J.C (2001) Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*, 7: 915-926.
45. - Liu J, Stevens J, Rote C.A, Yost H.J, Hu Y, Neufeld K.L, White R.L and Matsunami N (2001) Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*, 7: 927-936.
46. - Fagotto F, Gluck U and Gumbiner B.M (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*, 8: 181-190.
47. - Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, S Chatterjee, Murone M, Zullig S and Basler K (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear betacatenin-TCF complex. *Cell*, 109: 47-60.
48. - Townsley F.M, Cliffe A and Bienz M (2004) Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional coactivator function. *Nat Cell Biol*, 6: 626-633.

49. - Molenaar M, M van de Wetering, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O and Clevers H (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86: 391-399.
50. - Miller J.R, Hocking A.M, Brown J.D and Moon R.T (1999) Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, 18: 7860-7872.
51. - Oosterwegel M.A, van de Wetering M.L, Holstege F.C, Prosser H.M, Owen M.J and Clevers H.C (1991) TCF-1, a T cell-specific transcription factor of the HMG box family, interacts with sequence motifs in the TCR beta and TCR delta enhancers. *Int Immunol*, 3: 1189-1192.
52. - Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E and Polakis P (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*, 275: 1790-1792.
53. - Nusse R and Varmus H.E (1982) Many tumours induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31: 99-109.
54. - Kinzler K.W, Nilbert M.C, Su L.K, Vogelstein B, Bryan T.M, Levy D.B, Smith K.J, Preisinger A.C (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253: 661-665.
55. - Kinzler K.W and Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-170.
56. - Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T and Nakamura Y (1998) Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res*, 58: 2524-2527.
57. - Kim J.S, Crooks H, Foxworth A and Waldman T (2002) Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 1: 1355-1359.
58. - Lepourcelet M, Chen Y.N, France D.S, H Wang, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood A.W and Shivdasani R.A (2004) Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*, 5: 91-102.
59. - Castillo J.F (2005) Estudio molecular de la expresión de dos isoformas del gen de beta catenina en tumores de wilms de niños mexicanos. México D.F.

60. - Roberts GC, Smith CW (2002) Alternative splicing: combinatorial output from the genome. Review Curr Opin Chem Biol 6: 375-83.
61. - Cochet O, Heard DJ, Fehlbaum P, Ducray C, Bracco L (2003) Exploiting Human Genomic Diversity Through Alternative RNA Splicing. Review PharmaGenomics. 26-36.
62. - Kozak M (2003) Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. Review Gene 318:1-23.
63. - Kondrashov F, Koonin E (2003) Evolution of alternative splicing: deletions, insertions and origin of functional parts of proteins from intron sequences. Review Trends Genet.19:115-119
64. - Howng SL, Sy WD, Cheng TS, Lieu AS, Wang C, Tzou WS, Cho CL, Hong YR (2004) Genomic organization, alternative splicing, and promoter analysis of human dynamin-like protein gene. Biochem Biophys Res Commun 314: 766-772
65. - Brett D, Pospisil H, Valcárcel J, Reich J, Bork P (2001) "Alternative splicing and genome complexity". Nature Genetics 30: 29-30.
66. - Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. Review Trends Genet: 100-107.
67. - Celotto AM, Graveley BR (2001) Alternative splicing of the Drosophila Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. Genetics 159: 599-608.
68. - Medios y finalidades de la Proteómica En: <http://www.biotech.bioetica.org/docta30.htm>
69. - National Library of Medicine and the National Institutes of Health (MeSH) En: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=mesh&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=68020033&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Mesh.Mesh_ResultsPanel.Mesh_RVFull
70. - Thiele A, Nagamine Y, Hauschildt S, Clevers H (2006) AU-rich elements and alternative splicing in the β -catenin 3'UTR can influence the human β -catenin mRNA stability. Experimental Cell Research, 312: 2367-2378.
71. - Pospisil H, Herrmann A, Butherus K, Pirson S, Reich J.G and Kemmner W (2006) Verification of predicted alternatively spliced Wnt genes reveals two new splice variants (CTNNB1 and LRP5) and altered Axin-1 expression during tumour progression. BMC Genomics, 7: 1-14

72. - Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 275: 1787-1790.
73. – Yun-gang Z, Juan D, Xin-xia T, Yan-feng Z and Wei-gang F (2007) Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chinese Medical Journal*, 120: 1597-1605.
74. -. Sommers C. L, Edward P, Kemler R, Cowin P, and Byers S. W (1994) Alterations in β -Catenin Phosphorylation and Plakoglobin Expression in Human Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 54: 3544–3552.
75. - Zhen L, Lei Y, Dong-Xu C, Bao-Lin L, Xiao-Bo Z, Wen-Feng M and Qiang Z (2007) Methylation Status and Protein Expression of Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene in Breast Cancer. *Chinese Journal of cancer*, 26: 1-7
- 76.- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P and Foidart J.M (2003) Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 63: 2658–2664.
77. - Frago F. D. E (2008) Análisis de los perfiles de expresión de micro RNA's en cáncer de mama, Tesis de doctorado en. Biomedicina y Biotecnología Molecular, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
78. - <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR013558>
- 79.- Bustos V. H, Ferrarese A, Venerando A, Marín O, Allende J. E and Pinna L. A (2006) The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of B-catenin phosphorylation by protein kinase CK1. *PNAS*, 103: 19725-19730.