

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HOXB13 EN
CANCER MAMARIO USANDO PCR TIEMPO REAL”**

Por

Delia Carolina Reyna Alvarado

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
INMUNOBIOLOGÍA**

Septiembre 2010

**“CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HOXB13 EN
CANCER MAMARIO USANDO PCR TIEMPO REAL”**

Comité de Tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez
Director

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología y en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, bajo la dirección y asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez.



1. RESUMEN

El cáncer de mama es un grave problema de salud en México, representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, por lo que la búsqueda de marcadores moleculares que permitan su detección temprana es de primordial importancia. Estudios recientes en tejidos mamarios normales, tumores benignos y malignos indican que la alteración en la expresión de los genes HOX puede inducir o contribuir en la malignidad del cáncer de mama al regular eventos como el ciclo celular, apoptosis, la angiogénesis, y/o metástasis. En nuestro laboratorio Webb y cols. en el 2007, demostraron la expresión de los genes HOXA1 transcrito corto y transcrito medio, HOXA5 y HOXD3 preferentemente en tejidos normales y fibroadenomas, con una alta correlación entre su expresión y la ausencia de malignidad. Interesantemente, la expresión de HOXB13, se encontró exclusivamente en tejidos malignos desde los estadios tempranos I y II en muestras provenientes de adenocarcinomas ductales infiltrantes. Debido a lo anterior en esta tesis se realizó la detección y la cuantificación de la expresión relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real a partir de tejidos mamarios sanos, con patología benigna y maligna. Primeramente, se establecieron las condiciones para la detección y cuantificación de la expresión del gen HOXB13 en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares SiHa y MCF-7 por PCR Punto Final y PCR Tiempo Real, posteriormente con las mismas técnicas se detectó y cuantificó la expresión de HOXB13 en 88 muestras de tejidos mamarios que incluyeron 29 muestras de tejido normal, 56 muestras con patología maligna y solo 3 con patología benigna. La expresión de HOXB13 se detectó por PCR Punto Final desde el estadio I al III, en la mayoría de las muestras de tejido maligno analizadas (29 de 56), con una fuerte correlación con la presencia de malignidad. No se detectó la sobre-expresión de HOXB13 en ningún tejido con patología benigna y se detectó solamente en 5 de 29 tejidos normales. La cuantificación relativa por PCR Tiempo Real mostró la sobre-expresión de HOXB13 en 33 de los 56 tejidos mamarios con una expresión relativa que va desde 2.3 a 132,364. 63 veces. Así mismo, la cuantificación relativa por PCR Tiempo Real en las muestras con patología maligna en comparación con la línea celular MCF-7 mostró la sobre-expresión de HOXB13 en las mismas muestras con valores que van desde 1.08 a 33,406.42 veces. La alta sobre-expresión de los transcritos de HOXB13 en las muestras de tejido mamario analizadas proponen a este gen como un nuevo biomarcador molecular temprano en el diagnóstico, pronóstico, estadificación, monitoreo, localización y/o seguimiento del cáncer de mama.





2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa un problema importante de salud pública a nivel mundial, es la neoplasia más frecuente diagnosticada en la mujer. A pesar del gran cúmulo de información científica relacionada con su origen, nuevos métodos diagnósticos y tratamientos, la tasa de mortalidad se predice que aumentará a 1.5 millones en 2010 en el mundo (Boyle *et al.*, 2008; Beaulieu *et al.*, 2009). A nivel mundial, el cáncer mamario es el más común entre las mujeres, registrándose 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad (Beaulieu *et al.*, 2009).

En México, doce mujeres mueren diariamente de este cáncer, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con esta patología maligna (Knaul *et al.*, 2009). La tendencia observada en la mortalidad del cáncer mamario en este país muestra un incremento constante por lo que las muertes podrían evitarse si a estas pacientes se les tratara con un diagnóstico temprano. De acuerdo al Instituto Nacional de Cancerología en la década de 1990 a 1999, el cáncer de mama constituía el segundo lugar en frecuencia después del cáncer cervicouterino, mientras que en el periodo de 2000 a 2004 esta relación se invirtió. Actualmente, la tendencia observada en la mortalidad de esta enfermedad muestra un incremento constante. En nuestro país es más frecuente entre los 30 a 54 años, 10 años antes que el promedio en Europa y E. E. U. U. (Brandan & Villaseñor, 2006; Gancz & Candelaria, 2006; Knaul *et al.*, 2009). La importancia de un diagnóstico temprano para el cáncer de mama se destaca debido a que el 83.3% de las muertes se consideran evitables (Franco & Marina, 2006).

Debido a la alta incidencia del carcinoma de mama y a las limitaciones de los parámetros clásicos de pronóstico, ha sido importante establecer factores pronósticos adicionales que permitan determinar el riesgo de recurrencia y el tipo de terapia, entre otros parámetros. La búsqueda de nuevos marcadores moleculares ha aumentado considerablemente debido a que permiten un diagnóstico temprano, así como ciertas ventajas como reconocer la expresión alterada de una proteína, la cual es posible rastrear dentro de una célula, para correlacionar el nivel de alteración con la presencia o agresividad del tumor. Dentro de los marcadores moleculares mayormente estudiados en la biología del cáncer de mama y que son potenciales en la toma de decisiones en pacientes con estadios iniciales de la enfermedad se encuentran: marcadores de proliferación (Ki67), receptores hormonales (RE y RPg), factores de crecimiento (Her-2), receptores de estrógeno y progesterona que permiten la selección de tratamiento y aplicación clínica (Esteva y Hortobagay, 2004; Yamashita *et al.*, 2004).





Otro tipo de marcadores moleculares que han sido ampliamente estudiados son la proteína supresora de tumor, p53; o la proteína p27 que esta implicada en el control del crecimiento celular (Chang, 2002). En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la expresión de genes HOX, que regulan la embriogénesis y el desarrollo del plan corporal de diversos organismos (García- Bellido, 1977; Lewis, 1978). Recientemente, se han detectado algunos genes HOX en la regulación del desarrollo del tejido tumoral, específicamente en el paso previo a la activación de la cascada de eventos moleculares intracelulares que culmina con el desarrollo de cáncer. De manera que es muy relevante determinar el o los genes HOX que modifican la expresión antes del desarrollo del cáncer mamario como el o los marcadores moleculares que ayuden mejor al entendimiento de la evolución molecular de dicho cáncer, así como la prevención de esta neoplasia.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Webb (2007) muestran la expresión del gen HOXB13 en muestras de cáncer de mama pertenecientes a los estadios I y II demostrando claramente la expresión selectiva del transcrito de HOXB13 en 27 de 35 muestras neoplásicas analizadas, con una alta incidencia con la presencia de malignidad. Debido a lo anterior, es altamente relevante el análisis molecular para determinar lo que realmente sucede *in vivo* en los tumores mamarios, ya que la sobre-expresión de HOXB13 puede postularse como un posible marcador molecular del cáncer mamario para la detección de esta neoplasia en etapas tempranas e incluso en etapas previas a la formación del tumor.





3. HIPÓTESIS

Las muestras de tejido mamario maligno analizadas son capaces de presentar una alta expresión del gen HOXB13 con respecto al tejido mamario no maligno.





4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Cuantificar los niveles de expresión del RNAm del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en muestras de tejido mamario sano, con patología benigna y maligna.

4.2 Objetivos Específicos

1. Estandarizar las condiciones para la extracción de los RNA's totales y la amplificación del gen HOXB13 en las líneas celulares mediante RT-PCR y PCR Tiempo Real.
2. Detectar mediante RT-PCR la expresión de gen HOXB13 en las muestras de tejidos mamarios con y sin patología.
3. Cuantificar mediante PCR Tiempo Real los niveles de expresión de HOXB13 en tejidos de mama con y sin patología.
4. Correlacionar los valores encontrados de la expresión de HOXB13 obtenidos por PCR Punto Final y Tiempo Real en los tejidos mamarios con y sin patología maligna.
5. Análizar los resultados estadísticos obtenidos para verificar si hay diferencia significativa en los niveles de expresión del gen HOXB13 de tejidos mamarios con y sin patología maligna.





5. ANTECEDENTES

5.1 *La glándula mamaria adulta*

5.1.1 *Anatomía y fisiología de la glándula mamaria*

Las glándulas mamarias son estructuras ramificadas túbulo-alveolares de secreción externa, consideradas embriológicamente como glándulas sudoríparas modificadas en estructura y función (Pardo-Martínez *et al.*, 1998). En la mujer, las mamas se desarrollan de las crestas bilaterales de leche que se extienden en las extremidades superiores e inferiores; la mayoría de las crestas involucionan, quedando solo las mamas definitivas, solo en el 2-6% de la población presentan glándulas mamarias accesorias que desarrollan a partir de crestas que no involucionaron (Rosai, 1989). La unidad morfo-funcional de la mama es una simple glándula compuesta por dos partes principales: la Unidad Terminal Dúctulo-Lobular (UTDL) formada por el lóbulo y los conductos terminales que representan la porción secretoria de la glándula y el sistema ductal grande. La UTDL drena a través del conducto subsegmentario al segmentario, el cual se continua con el conducto lactífero, antes de la apertura en el pezón se forma una dilatación denominada seno lactífero, que constituye un reservorio para la leche. La funcionalidad de la glándula mamaria se alcanza después del embarazo, donde ocurre un elevado desarrollo de los compartimientos lóbulo-alveolares que producen leche (Lester & Cotrain, 2000).

El sistema epitelial ductal-lobular de la mama está formado por una doble capa de epitelio que contiene células epiteliales rodeadas por células miopiteliales (Woodward *et al.*, 2005). La mama madura es una glándula túbulo-alveolar compleja compuesta por 15 a 25 lóbulos dispuestos en forma radial, el lóbulo está dividido en lobulillos contenidos dentro de estroma de tejido conectivo laxo, muy bien delimitado del tejido fibro-adiposo que conforma el volumen de la mama (Pardo-Martínez *et al.*, 1998; Kufe *et al.*, 2003; Lewis, 2000). La mama posee una red de vasos linfáticos que drenan hacia cúmulos de ganglios linfáticos situados en la axila, sobre la clavícula, y el pecho (NCI-USNIH, 2007). Por su parte, la irrigación de la mama está dada por arterias internas y externa y recibe vasos de algunas anastomosis de la arteria intercostal de la rama pectoral de la arteria acromiotorácica. Como sistema de contención actúa el músculo pectoral que se encuentra entre las costillas y la mama. La piel protege toda la estructura mamaria (Pardo-Martínez *et al.*, 1998; Kufe *et al.*, 2003; Lewis, 2000).





En la infancia, las ramificaciones de la glándula terminan en los conductos terminales, en la pubertad se desarrollan los acinos, los cuales se mantienen en reposo hasta el embarazo, donde ocurre una proliferación de los acinos y del estroma intralobulillar, seguida de la fase de secreción en donde aparecen lúmenes. Al llegar la menopausia, las estructuras involucionan y aumenta el tejido conectivo circundante (Etchart, 1996).

5.1.2 Control hormonal del desarrollo de la mama

El control hormonal del desarrollo completo de la mama depende de una variedad de hormonas de diferente procedencia. Tanto el ovario y el cuerpo lúteo, como las glándulas suprarrenales, la hipófisis, y la placenta, contribuyen con la producción hormonal necesaria para la lactancia como se puede observar en la Figura 1. Cuatro hormonas juegan un papel fundamental en el desarrollo de la mama, en el embarazo, así como en la lactancia: *Estrógenos, progesterona, prolactina y oxitocina*.

Los estrógenos, en general, se encargan de la proliferación de los conductos, mientras que la progesterona estimula el desarrollo de los lóbulos mamarios, y son secretados por el ovario y por el cuerpo lúteo, además de la placenta. En murinos, se requiere de la prolactina para el desarrollo de las mamas durante la pubertad, mas se desconoce si este es el caso en humanos. Además se requiere de glucocorticoides, insulina y hormona del crecimiento para el desarrollo de las glándulas, aunque no actúan como iniciadores de éste.

Durante el embarazo, la cantidad de prolactina aumenta hasta el parto, se produce gonadotropina coriónica, mamotropina coriónica, y junto con las elevadas concentraciones de estrógenos y progesterona, se lleva a cabo el desarrollo completo lóbulo-alveolar de las mamas. Después de la expulsión de la placenta disminuyen marcadamente los estrógenos y la progesterona en la cual la disminución de los estrógenos en sangre da inicio a la lactancia, ya que los estrógenos bloquean el efecto productor de leche de la prolactina (Ganong, 1994). Para la secreción y expulsión de la leche se requiere de oxitocina, la cual hace que las células mioepiteliales que tapizan los conductos se contraigan, con la consiguiente liberación de la leche por medio del pezón. La oxitocina no es esencial para la expulsión de la leche en otras especies, pero en la mujer si. El amamantamiento provoca la liberación de oxitocina, además de mantener y aumentar la secreción de prolactina provocada por la succión del pezón (Ganong, 1994).



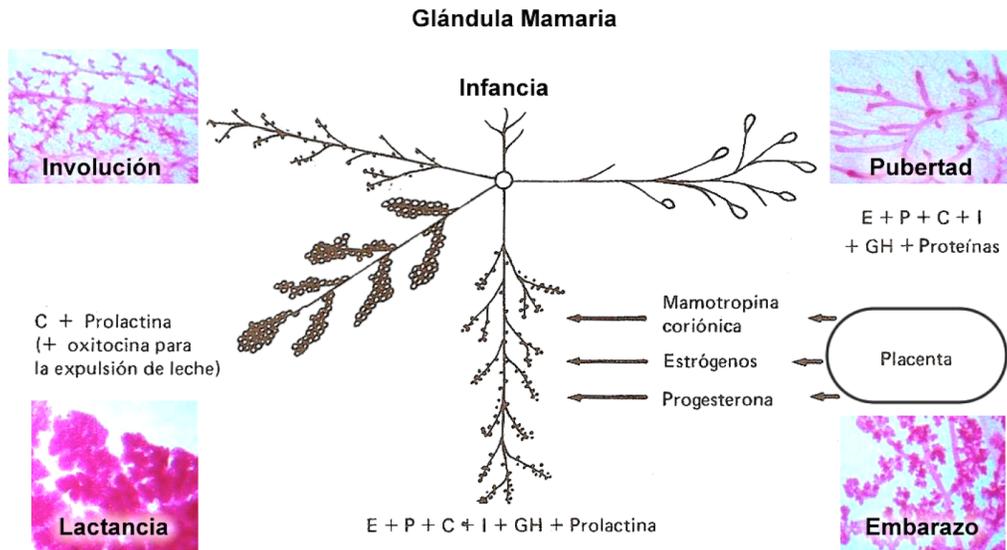


Figura 1. Control hormonal del desarrollo de la mama y de la lactancia en murinos. Los estrógenos (E), bajos niveles de progesterona (P), prolactina en presencia de glucocorticoides (C), insulina (I) y hormona del crecimiento permiten la proliferación de los conductos en la pubertad. Durante el embarazo, todas estas hormonas producen el desarrollo alveolar completo y algo de secreción láctea. Después del parto, la mayor secreción de prolactina y la disminución de las cifras de estrógenos y progesterona producen una secreción copiosa y con la presencia de oxitocina y la expulsión de la leche. La mamotropina coriónica es la hormona lactógena secretada por la placenta de ratas, es análoga a la somatomamotropina coriónica humana (hCS) y suplementa la acción de la prolactina. Una vez retirado es estímulo de la lactancia, la glándula involuciona. *Modificado de Ganong, 1994. Imágenes de Hennighausen & Robinson, 1998.*

5.2 Patologías de la glándula mamaria

Las patologías de la glándula mama se pueden clasificar en patologías benignas o malignas, estas últimas denominadas como cáncer y carcinomas al tener origen epitelial.

5.2.1 Patologías benignas

Las patologías benignas de la mama son las llamadas “enfermedades fibroquísticas”, “displasias mamarias”, o “mastopatías benignas”, las cuales se refieren a un rango de cambios en la mama, desde la nodularidad cíclica hasta la enfermedad proliferativa benigna que se observa en una biopsia. Una tumoración o tumor es la afectación más común en la mama, sin embargo, no todos los tumores presentan las características del cáncer o



malignidad-invasión, rápida duplicación celular y la capacidad de esparcirse a otros órganos o metástasis. Aproximadamente el 70% de los tumores no representa un riesgo de salud y se denominan tumores benignos, lo cual indica un elevado 30% de probabilidad de cáncer (Pilnik, 2003). Los tumores benignos son proliferaciones que presentan una morfología similar a la mama normal (no presentan atipias), con un aumento en el número de acinos glandulares mamarios (hiperplasias lobular) o de las células epiteliales de los conductos (hiperplasia ductal), o ambos junto a una marcada fibrosis circundante (fibroadenoma), y no presentan diseminación a otras partes del cuerpo (metástasis) (Kufe *et al.*, 2003). Los tumores benignos más comunes son los fibroadenomas, compuestos de tejido fibroso y glandular (Knaus & Hall, 2003).

Las enfermedades benignas que no incrementan el riesgo de padecer cáncer son: la adenosis no esclerosante, la ectasia ductal, los fibroadenomas sin características complejas, la fibrosis, la mastitis, la hiperplasia ductal leve sin atipias, los quistes microscópicos o grandes, la metaplasma apócrifa sin asociación a hiperplasia o adenosis, y la metaplasma escamosa.

Las patologías benignas que aumentan ligeramente el riesgo son: el fibroadenoma complejo, la hiperplasia ductal florida o moderada sin atipias, la adenosis esclerosante, el papiloma solitario sin hiperplasia atípica.

Las patologías que incrementan moderadamente el riesgo de desarrollar cáncer son la hiperplasia ductal atípica y la hiperplasia lobular atípica (Knaus & Hall, 2003, <http://www.uscap.org/newindex.htm?iap2006/slides04-4.htm>)

5.2.2 Patologías malignas

La mama es un microambiente donde cada tejido sigue un programa molecular determinado que rige el nacimiento de sus células, su muerte, el hábitat, el límite territorial, y el mantenimiento de una población celular, donde alteraciones graves en estos procesos resultan en una pérdida del equilibrio de este microambiente (Alberts *et al.*, 2002). Las patologías malignas de la mama suelen tener su origen en el componente epitelial que forma la glándula y se denominan carcinomas; aunque también pueden presentarse de manera muy esporádica sarcomas derivados de tejido conectivo que conforma el resto de la mama, como los fibrosarcomas, liposarcomas, osteosarcomas, angiosarcomas y otros tumores no epiteliales malignos (Etchart, 1996). La manera en la que el tejido mamario cambia de un estado normal a un estado maligno, mas que metamorfosis, suele ser el





resultado de la dominancia de una célula cuyo programa molecular alterado le permite proliferar sin control e invadir órganos o tejidos.

5.2.2.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la segunda patología más común en la mama, representando el 30% de los tumores que se presentan en la mujer tal es el caso de cáncer cervicouterino, de pulmón, ovario, etc. (Pilnik, 2003). El cáncer de mama consiste en un crecimiento anormal y desordenado de las células del tejido mamario, macroscópicamente, se presenta como una masa firme, de tamaño variable, granulosa, de color blanco, seca; cuyo contorno puede ser policíclico o infiltrante (Etchart, 1996). Dentro de los tumores malignos de mama, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produce el crecimiento anormal de las células y se pueden clasificar según su crecimiento. Los tumores pueden ser localizados o extenderse, a través de los vasos sanguíneos o linfáticos y dar lugar a metástasis. De todos los casos de cáncer de mama, solo el 7% de ellos presentan metástasis de inicio (Harris *et al.*, 1993). Al microscopio, el carcinoma mamario ha sido clasificado desde muchos puntos de vista: grado de diferenciación tubular, irregularidad o atipia de los núcleos, proporción del tejido conjuntivo acompañante, presencia de receptores hormonales, semejanza de las células tumorales con las normales. Según estos criterios se pueden distinguir los carcinomas basándose en el tipo de célula neoplásica, en particular, en carcinomas de conductos-ductal- y carcinoma lobulillar. Los carcinomas de conductos a su vez se clasifican descriptivamente, pero esta clasificación es de valor dudoso en cuanto al pronóstico y el 80% de los casos no presentan una estructura histológica especial (Kufe *et al.*, 2003). Prácticamente todos los tipos de cáncer mamario pueden presentar formas *in situ* o infiltrante (Etchart, 1996). Se denomina *in situ* a los tumores que no han atravesado la membrana basal que lo contiene, considerándose como una etapa previa a la tumoración infiltrante, la cual no está circunscrita al tejido que la originó, y ha invadido y degradado otros tejidos circundantes, como el muscular (<http://www.uscap.org/newindex.htm?iap2006/slides04-4.htm>; Kufe *et al.*, 2003). El cáncer de mama presenta un largo periodo de desarrollo, es una enfermedad compleja con una etiología multifactorial (Stewart & Heppner, 1997). Muchos factores que estimulan o inhiben el crecimiento celular, influyen en el crecimiento y proliferación de las células de cáncer de mama. Las hormonas esteroideas, los factores de crecimiento y las citocinas





influyen en la conducta y expresión fenotípica de las células de la mama (Hortobagyi, 1998).

5.2.2.2 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama a nivel mundial es el cáncer más común entre las mujeres registrándose 411, 000 muertes al año a causa de esta enfermedad. Éste es el cáncer más prevalente a nivel mundial y según datos sobre de incidencia y mortalidad disponibles, se estima que en el año 2002, se diagnosticaron aproximadamente 10.9 millones de casos nuevos de cáncer (Ferlay *et al.*, 2002; Parkin *et al.*, 2005). El cáncer de mama es la segunda causa de cáncer más frecuente, en el mundo, si unimos ambos sexos, es solo precedida por el cáncer del pulmón. Se estima que se han diagnosticado 1. 15 millones de casos nuevos de cáncer de mama en el año 2002, el 23% de todos los nuevos casos de cáncer en las mujeres, a escala mundial. (Parkin & Fernández, 2006). Por otro lado, la combinación de su elevada incidencia y su relativo “buen pronóstico” hacen del cáncer de mama la localización de cáncer más prevalente en el mundo. El cáncer de mama y el resto de los cánceres ginecológicos representan más del 50% de los casos de cáncer prevalentes tanto en países desarrollados como en desarrollo (Pisani *et al.*, 2002). Según los estimados, existen en el mundo aproximadamente 4.4 millones de mujeres vivas, diagnosticadas de cáncer de mama en los últimos 5 años; hecho importante si se compara con sólo 1.4 millones de sobrevivientes (hombres y mujeres) de cáncer de pulmón (Parkin & Fernández, 2006). En 2009 se proyectan 1.35 millones de nuevos casos, que aumentará a 1.5 millones en 2010. El cáncer mamario corresponde al 10. 5% de todos los nuevos casos de cánceres-el único tipo de cáncer que registra más casos es el de pulmón (Boyle & Levin, 2008; Beaulieu, 2009).

El 45% de los casos, así como la mayoría de las muertes por cáncer mamario, se registran en los países en vías de desarrollo, y se estima un aumento en las proporciones-tanto de casos como de muertes (Boyle & Levin, 2008; Porter 2008; Knaul *et al.*, 2009). De los 1.35 millones de nuevos casos proyectados para 2009, 69, 000 se ubican en los países de ingresos bajos, 415, 000 en los países de ingreso medio-bajo y 224,000 en los países de ingreso medio-alto (Beaulieu *et al.*, 2009).

Debido a las muertes tempranas por cáncer mamario la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que los años de vida perdidos (AVISA) por cáncer mamario son alrededor de 600, 000 en la región de Latinoamérica, cifra tres veces mayor que los años perdidos por muertes de cáncer pulmonar. En ausencia de intervenciones efectivas en los





sistemas de salud para la detección y control del cáncer mamario la cifra aumentará a 900,000 AVISA en el 2020 .

Estas cifras son aún mas impactantes si se considera que la estructura de edades de la población de estos países es más joven. Sin embargo, aun prevalece la concepción errónea de que el cáncer mamario es un problema de mujeres de edad avanzada y de países de altos niveles socioeconómicos. Por lo mismo, el cáncer de mama se considera una prioridad apremiante para la salud publica de los países en vías de desarrollo aun desapercibida y hasta ignorada por las mujeres y los sistemas de salud, y que ha crecido y seguirá creciendo (Anderson *et al.*, 2006; Boyle y Levin, 2008; Porter, 2008; Kanul *et al.*, 2009).

En México, doce mujeres mueren diariamente a causa de cáncer mamario, lo cual representa, aproximadamente, una tercera parte de las pacientes diagnosticadas con este tumor maligno (Knaul *et al.*, 2009). La tendencia observada en la mortalidad de esta enfermedad en este país muestra incrementos constantes; basta mencionar que en el período de 1980 a 2005 se registraron un total de 67,854 defunciones por cáncer mamario, con un aumento estimado anual del 3.6% en los últimos 18 años (Franco *et al.*, 2009). Adicionalmente, a partir de 2006 el cáncer mamario es la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 54 años y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cervicouterino (Kanul *et al.*, 2009).

Las tasas de mortalidad ajustadas por edad presentadas en la Figura 2 muestran que la mortalidad por cáncer cervicouterino en las mujeres mexicanas superó la mortalidad por cáncer de mama en el período 1955-2005. En 1980 el riesgo de morir por cáncer cervicouterino era dos veces mayor respecto del cáncer de mama. No obstante, desde 1990 las tasas de mortalidad por este cáncer descienden en forma rápida y constante. En sentido inverso, a los largo del mismo período, las tasas de mortalidad atribuibles al cáncer de mama se incrementaron y para el año 2006, por primera vez, el cáncer de mama superó al cáncer cervicouterino como causa de muerte entre las mujeres mexicanas (Figura 3) (Knaul *et al.*, 2009).



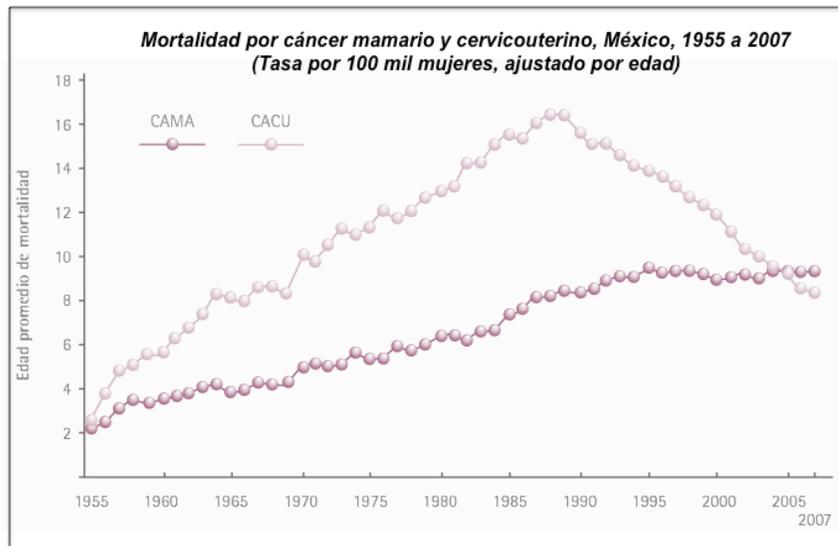


Figura 2. Mortalidad por cáncer mamario y cervicouterino en México entre los años 1955 a 2007. La figura muestra la mortalidad por cáncer cervicouterino (CACU) en donde se indica que en las mujeres mexicanas superó la mortalidad por cáncer de mama (CAMA) en el período 1955-2005. Sin embargo, para el año 2006 el cáncer de mama superó al cáncer cervicouterino como causa de muerte. Fuente Knaul *et al.*, 2009, con base en datos de la OMS (1955-1979) y la Secretaría de Salud (1978-2002).

Este fenómeno -la disminución de la morbilidad y mortalidad por cáncer cervicouterino en comparación con el cáncer mamario- se observa no sólo a nivel nacional, sino también a nivel estatal y entre áreas geográficas, tanto en aquellas con un desarrollo económico mayor como en las zonas con un desarrollo económico menor. La frecuencia del cáncer de mama y el riesgo de morir por cáncer mamario es ha aumentado en la gran mayoría de las entidades federativas de la Republica Mexicana, aunque el fenómeno es mayor en los estados del norte y centro del país, donde el nivel socioeconómico y cultural de las mujeres es más elevado. (Palacio *et al.*, 2009). Esto ubica al estado de Nuevo León en segundo lugar después del Distrito Federal en cuanto a mortalidad se refiere por cáncer de mama (Bigbee & Herberman, 2003; Knaul *et al.*, 2008).

El cáncer de mama también afecta a los hombres pero el porcentaje es mucho menor, el 1% comparado con la población femenina que lo padece. El cáncer de mama masculino tiene características inmunofenotípicas que lo diferencia del cáncer de mama que ocurre en la mujer, lo que implicaría una patogénesis diferente en la evolución y progresión de la enfermedad en los hombres (Muir *et al.*, 2003).



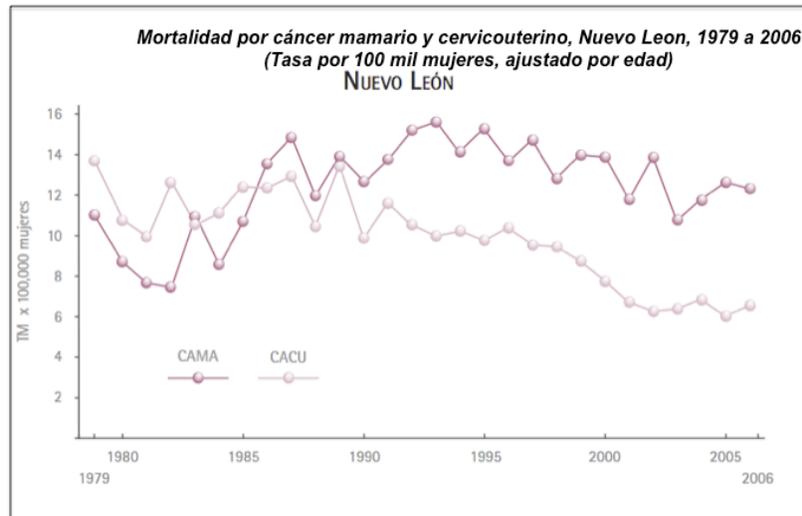


Figura 3. Mortalidad por cáncer mamario y cervicouterino en el estado de Nuevo León entre los años 1979 a 2006. La figura muestra la mortalidad obtenida por cáncer de mama (CAMA) en una comparación con cáncer cervicouterino (CACU) en las residentes de el estado de Nuevo León entre los años 1980 a 2006. Fuente Knaul et al., 2009, con base en datos de la Secretaria de Salud (1979-2006).

5.2.2.3 Tipos de cáncer de mama

El cáncer mamario ha sido clasificado de acuerdo a su invasión en: carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo, y de acuerdo a su origen celular en ductal o lobulillar. En la Figura 4 se muestra una representación esquemática de la estructura de la glándula mamaria así como las lesiones más frecuentes en sus diferentes estructuras. A continuación se puede observar la descripción de ambos tipos de cáncer:



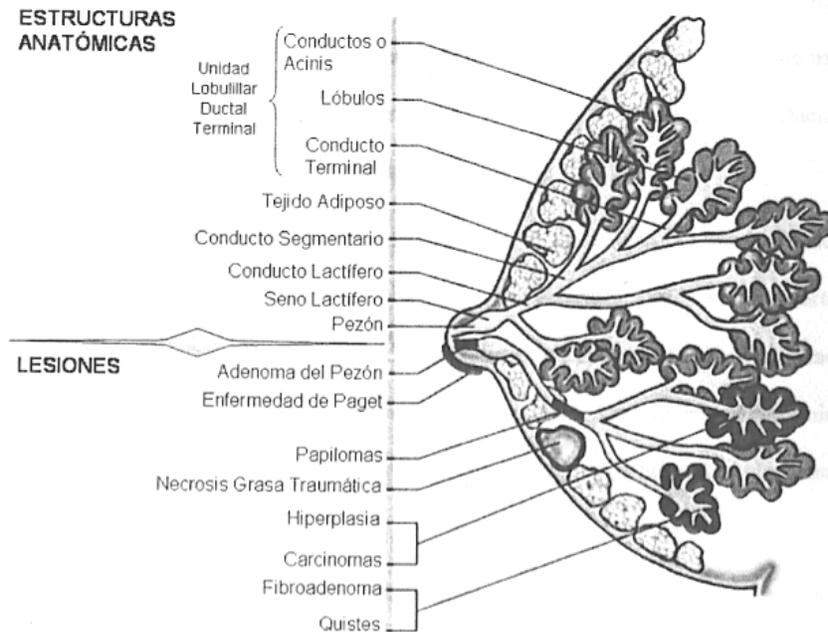
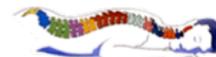


Figura 4. Estructura de la glándula mamaria y lesiones más frecuentes en sus diferentes estructuras.
Adaptado de Llanes, 2006.

5.2.2.3.1 *Carcinoma in situ*

El carcinoma ductal *in situ* se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Se caracteriza por una proliferación de las células epiteliales de los conductos mamarios que carecen de capacidad para atravesar la membrana basal y por lo tanto son incapaces de producir metástasis a distancia (Lester & Cotrain, 2000). Es el tipo más común de cáncer de mama y la cifra de curación en las mujeres que presentan este tipo de tumor es elevada (Gasparini *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 1996). Este tipo de cáncer ha sido clasificado en subtipos diferentes de acuerdo a la arquitectura del tejido y ésta forma de cáncer es localizado y no representa un estadio invasor. Existen tres subtipos principales de carcinoma *in situ* en base a su origen celular: carcinoma intracanalicular, carcinoma lobulillar *in situ* y carcinoma papilar intracanalicular. Estos se originan en la unidad lobulillocanalicular terminal.



El carcinoma lobular *in situ* se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y se caracteriza por una proliferación de las células epiteliales malignas de los lóbulos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas. Este tipo de tumor es bilateral en un 50 y 70% de los casos (Elston & Ellis, 1991; Harris *et al.*, 1993; Fitzgibbons *et al.*, 2000).

El carcinoma intracanalicular incluye casi en que se detecta una proliferación epitelial irregular y atípica, con núcleos hiper cromáticos y figuras de mitosis. Esta proliferación intracanalicular puede originar masas sólidas o adematosas. Se comprende que el cáncer tanto puede afectar a la porción ductal, como a la lobulillar. Y ambas localizaciones pueden, a su vez, ser coincidentes. Inicialmente, este tipo de tumor comienza con una proliferación maligna no infiltrante; es decir, que respeta o no rompe la membrana basal del epitelio intracanalicular (Junceda, 1988).

Por otro lado, el carcinoma papilar intracanalicular se refiere cuando el carcinoma intracanalicular no infiltrante o *in situ*, ofrece un cierto aspecto papilar con su proliferación vegetante intraluminal o intragalactofórica, con sus típicas vegetaciones papilares (pérdida de la polaridad celular, alteraciones nucleocitoplásmicas, anisocariosis, hiper cromatismo, etc.). Este carcinoma fue descrito por Bloodgood en 1893 y Junceda, 1988.

5.2.2.3.2 Carcinoma infiltrante (o invasivo)

El carcinoma ductal infiltrante es referido como Adenocarcinoma Ductal Infiltrante o ADI el cual se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos de cáncer de mama invasivos (Abba *et al.*, 2004). Este tipo de tumor comúnmente presenta metástasis a los ganglios linfáticos axilares (Gasparini *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 1996). Este carcinoma crece en todas las direcciones por lo que se puede infiltrar y fijarse a la fascia profunda de la pared torácica, la piel sufre retracción al igual que el pezón. Asimismo, en este carcinoma hay invasión de los vasos linfáticos y ganglios provocando edema, engrosamiento y dolor con eritema. Dentro de este grupo existen varios subtipos que se describen a continuación:





Carcinoma lobular infiltrante

El carcinoma lobulillar es el segundo carcinoma de mama detectado, constituyendo el 10% y se origina a partir de células de los lobulillos. Este tipo de tumor comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender a otros tejidos de la mama y del cuerpo. Se caracteriza por la presencia de células tumorales pequeñas que infiltran el tejido mamario adiposo de la mama, las cuales habitualmente crecen alrededor de los lobulillos normales. Este tipo de tumor es frecuentemente multicéntrico y bilateral (Elstón, 1991; Harris *et al.*, 1993; Fitzgibbons *et al.*, 2000). Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son del tipo Carcinoma lobular infiltrante (Arpino *et al.*, 2004) y se caracteriza por una proliferación de las células epiteliales malignas de los lóbulos mamarios (Elstón & Ellis, 1991; Harris *et al.*, 1993; Fitzgibbons *et al.*, 2000). La forma infiltrante suele nombrarse Adenocarcinoma Lobulillar Infiltrante o ALI, donde se observan células dispuestas en fila, sin formar estructura como brotes o papilas y es de mejor pronóstico que el ADI.

Carcinoma medular

El Carcinoma medular es un tipo de carcinoma poco frecuente que presenta un tumor grande, bien delimitado, blando y se considera de me mejor pronóstico que el ductal común. Estos tumores mamarios son generalmente de tamaño mayor que el promedio y de mejor pronóstico, se caracterizan por lesiones circunscritas con bajo grado de propiedades infiltrantes y un intenso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. El Carcinoma medular constituye entre el 5 y 7% de todos los carcinomas mamarios (Gaffey *et al.*, 1995; Hadden, 1995).

Carcinoma tubular

El Carcinoma tubular es un carcinoma bien diferenciado el cual se caracteriza por la formación de túbulos que carecen de capas de células mioepiteliales donde las células tumorales están en contacto de capas de células mioepiteliales y en contacto directo con el estroma. Estos tumores pueden ser multifocales y bilaterales y son de muy buen pronóstico (Harris *et al.*, 1993).

Carcinoma mucinoso

El Carcinoma mucinoso es un tumor maligno de conductos, de mejor pronóstico y de crecimiento lento; es una variante poco frecuente de carcinoma ductal, el cual comprende cerca del 3% de todos lo carcinomas de la mama y suele afectar a mujeres de edad avanzada. Este tumor se caracteriza por una alta expresión de mucinas, en las que el estudio





histológico muestran grandes lagos de mucinas dentro de los cuales se encuentran pequeños islotes de células neoplásicas aisladas (Gaffey *et al.*, 1995).

Carcinoma papilar infiltrante

El Carcinoma papilar infiltrante es poco frecuente, representa menos del 1% de los carcinomas infiltrantes y la arquitectura papilar se observa con mayor frecuencia en los carcinomas ductal *in situ*. La presentación clínica de éste carcinoma es semejante a la de los carcinomas ductales convencionales pero tiene mejor pronóstico (Lester & Cotrain, 2000).

Carcinoma inflamatorio del seno

El Carcinoma inflamatorio del seno es un cáncer poco común, tiene mal pronóstico (Harris *et al.*, 1993), tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores de la mama, es agresivo y de crecimiento rápido. Este carcinoma hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura y la apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias en ella. Estos síntomas son debidos al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.

5.2.2.4 Clasificación por etapas clínicas

El cáncer de mama ha sido clasificado por diversos métodos, con el propósito de planear una estrategia de terapia más adecuada para el paciente, permitir un pronóstico más acertado, y lograr una comparación de los resultados terapéuticos obtenidos con distintos protocolos. Los marcadores moleculares representan nuevas variaciones a los métodos comunes que se ponen en práctica hoy en día (Kufe, 2003). El estadio del cáncer de mama es esencial en la evaluación del tumor, determinación del tipo de tratamiento, estimación del pronóstico y permitir una comparación entre los diferentes programas de tratamiento (Harris *et al.*, 1993, Woodward *et al.*, 2003).

El cáncer de mama se clasifica sobre la base de la extensión anatómica de la lesión en cuatro estadios; cada estadio identifica un grupo de tumores que tienen aproximadamente un pronóstico similar. El estadio del carcinoma es un importante factor pronóstico de la supervivencia y su valoración es crucial en el tratamiento de las pacientes.

Por otra parte, la clasificación TNM, que se basa en el tamaño del tumor (T), nódulos afectados (N), y metástasis (M), fue diseñada y propuesta en 1958 por la International Union Against Cancer (UICC; Comité on Clinical Stage Classification and Applied





Statistics, 1958) y fue aceptada por el American Joint Commission on Cancer Staging (AJCC) como estándar mundial. Esta clasificación considera el tamaño del tumor; la presencia, el número y la ubicación de los nódulos linfáticos regionales afectados, y la diseminación de este tumor a otros sitios del cuerpo (metástasis).

La letra T seguida por un número que va del 0 al IV, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos.

La letra N, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras.

La letra M, seguida por 0 o 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes o a ganglios linfáticos no próximos a la mama. Ambos sistemas de estadiamiento se relacionan entre sí.

Asimismo, la AJCC utiliza una estadificación que engloba a la TNM, estableciendo etapas de 0 a IV (Kufe, 2003). Una descripción más detallada de este sistema de clasificación se muestra en la Tabla I, así como sus características.

5.3 Métodos de detección y diagnóstico del cáncer de mama

Los métodos para el diagnóstico de esta patología en mujeres sanas, con el fin de detectar el cáncer de mama en etapas tempranas de la enfermedad comprenden: la autoexploración, el examen clínico completo y los exámenes paraclínicos para la confirmación del diagnóstico como: la mamografía, la ecografía mamaria, las imágenes de resonancia magnética (I.R.M.), la tomografía por emisión de positrones (T.E.P.), la toma de biopsias con aspiración con aguja y la biopsia quirúrgica. A partir de la biopsia o de los procesos quirúrgicos completos, se determina la condición biológica del tumor y se da un pronóstico (Levin, 2005; Brandan & Villaseñor, 2006). Existen reportes en países desarrollados de Europa y Canadá donde se ha logrado que algunos programas que han sido ejecutados durante varios años finalmente tengan éxito en la reducción de mortalidad por cáncer de mama. No obstante, existen aun muchas incertidumbres y divergencias de criterios en cuanto a la edad óptima de iniciar estos programas, la efectividad de cada uno de estos métodos y los intervalos entre las pruebas. Esto complica su aplicación en países con limitaciones económicas (Direckersin *et al.*, 1999, Baines, 2000).



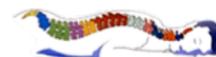


Tabla I. Etapas clínicas del cáncer de mama	
Etapas clínicas	Características
Etapa 0	<ul style="list-style-type: none"> Enfermedad <i>in situ</i> (en el sitio) en la cual las células cancerosas se mantienen en su ubicación original dentro del tejido mamario. Conocido como carcinoma canalicular <i>in situ</i> (DCIS,) o carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (LCIS), dependiendo del tipo de células involucradas y la localización, es un estado precanceroso.
Etapa I	I. El tumor es menor de 2 cm. y no hay metástasis.
Etapa II	II. El cáncer no mide más de 2 cm. pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados.
Etapa IIA y IIB	III. El cáncer mide entre 2 y 5 cm. y puede haberse extendido o no. IV. El cáncer mide hasta 5 cm. pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados.
Etapa III	<i>Etapa IIIA</i> V. El tumor mide menos de 5 cm. y se disemina a los ganglios linfáticos axilares, y estos están unidos entre sí a otras estructuras. VI. El tumor mide más de 5 cm. y los ganglios linfáticos axilares también están afectados.
Etapa IIIA y IIIB	<i>Etapa IIIB</i> <ul style="list-style-type: none"> El cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax). El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.
Etapa IV	VII. El cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suelen aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, pulmones, hígado o cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel y a los ganglios linfáticos dentro del cuello, cercanos a la clavícula.

5.4 Etiología y factores de riesgo del cáncer de mama

La etiología del cáncer de mama no es conocida, en numerosos estudios se investigan los posibles factores para predecir y cuantificar el riesgo de padecer la enfermedad, aunque en más del 80% de mujeres está aparece de manera esporádica sin factores de riesgo que lo explique (Salazar *et al.*, 1998). La etiología del cáncer de mama es multifactorial, aunque se considera que los estrógenos y la progesterona juegan un papel primordial en la tumorigénesis, ya que estas hormonas estimulan la proliferación de la mama. Además de las hormonas esteroideas, los factores de crecimiento, y las citocinas influyen en la conducta y expresión fenotípica de las células de la mama (Kufe *et al.*, 2003; Yáñez-





Fernández, 2006). Los factores de riesgo son aquellos elementos que pueden aumentar la probabilidad de que una persona desarrolle la enfermedad y en particular el cáncer de mama esta asociado con niveles socioeconómicos altos, lo que prácticamente se explica por la distribución diferente de tales factores (la mayoría de tipo reductivo), entre las diferentes clases sociales (Ghadirian, 1998).

En el mundo, la incidencia del cáncer de mama continua en aumento y la mortalidad ha permanecido casi inalterada durante las últimas décadas. Muchas de las diferencias que se encuentran entre grupos étnicos o regiones del mundo con relación a la incidencia de cáncer de mama, se deben a factores relacionados con los estilos de vida y las exposiciones ambientales. Prueba de esto, son los estudios de incrementos del riesgo en inmigrantes europeos de regiones de bajo riesgo como Italia y Polonia hacia regiones de alto riesgo como Australia, particularmente si estas migraciones ocurren en la infancia (Geddes & Parkin, 1993; Tyczynski *et al.*, 1994).

A pesar de las numerosas incertidumbres que rodean el origen del cáncer, hay evidencias sustanciales que el riesgo de cáncer de mama se relaciona con factores de tipo hormonal y reproductivo. En el cáncer de mama el factor más importante es la edad ya que el riesgo de padecer esta enfermedad, aumenta considerablemente después de los 50 años. Se menciona el incremento del riesgo con la menarquia temprana, la menopausia tardía, la edad tardía del primer parto y la baja paridad. Además, se mencionan otros factores con la historia familiar de cáncer de mama en uno o más familiares de primer grado y los factores genéticos, así como otros factores relacionados con los estilos de vida como son, el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos orales, la ausencia de lactancia materna, la obesidad y la dieta (Parkin *et al.*, 2000; Parkin & Fernández, 2006).

El cáncer de mama se presenta como un problema de salud pública serio, y se espera que la identificación de factores genéticos y microambientales que contribuyen al desarrollo de cáncer de mama reforzará los esfuerzos para la prevención ya que los principales factores de riesgo-edad, edad temprana de menarquia y tardía en menopausia, lugar de residencia-representan estilos de vida y patrones reproductivos, no son posible de modificar. Por lo que se busca la detección temprana y estrategias de tratamiento (Martín *et al.*, 2000, Brandan & Villaseñor, 2006).





5.4.1 Factores de Predisposición

Además de los factores de riesgo, se consideran los factores que predisponen a una persona a desarrollar cáncer de mama. Estos se clasifican en factores genéticos, factores hormonales y marcadores moleculares.

5.4.1.1 Factores genéticos

El principal factor genético de herencia en el cáncer de mama son las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, situados en los cromosomas 17q2 y 13q3, y se piensa que mutaciones de ellos pueden ser responsables hasta de 10% de todos los casos de cáncer de mama (Cotran *et al.*, 1999, Pericaza *et al.*, 2001, Parkin & Fernández, 2006). Estas mutaciones se han asociado al 90-95% de las neoplasias familiares, siendo el resto asociado a genes supresores de tumores. El papel del gen *BRCA1* en el desarrollo de cáncer esporádico está comenzando a dilucidarse, pues se ha encontrado que la pérdida de heterocigocidad en la región 17q21 está presente en más del 50% de las neoplasias de mama y ovario (Ross *et al.*, 2003).

Las mutaciones en la línea germinal en los genes *BRCA 1* y *BRCA 2* se asocian con un riesgo de desarrollar cáncer de mama del 46-87% para *BRCA 1* y 26-84% para *BRCA 2*. No obstante, solo aproximadamente el 10% del total de los cánceres de mama son causados por mutaciones en la línea germinal en los genes de susceptibilidad (Rogoski-Szczepka *et al.*, 2004).

Por otra parte, la mayor parte de las mujeres con el síndrome de Li-Fraumeni (sarcomas y carcinomas múltiples) poseen mutaciones en la línea germinal del gen supresor de tumor p53, localizado en el cromosoma 17p. Las mujeres con la enfermedad de Cowden (síndrome del hamartoma múltiple debido a una mutación en un gen localizado en el cromosoma 10) presentan un riesgo del 30 al 50% del cáncer de mama a los 50 años de edad, y las portadoras heterocigóticas del gen de la ataxia-telangiectasia (gen *ATM*, cromosoma 11q) presentan un riesgo del 11% a la misma edad (Cotran *et al.*, 1999). De esta manera, al presentarse antecedentes familiares directos, el riesgo de presentar cáncer de mama es de 2-3 veces mayor que la población sin estos antecedentes. Debe tomarse en cuenta que en el 85% de los casos no hay evidencia de historia familiar. Otros genes asociados débilmente son el gen *RAS*, el gen *hMSH2* y *hMLH1*, el gen de la





neurofibromatosis 1, y el receptor de andrógenos en casos de cáncer de mama en hombres (Ross *et al.*, 2003).

Por otra parte, la incidencia global de cáncer de mama por raza nos indica que es menor en mujeres de raza negra, sin embargo este grupo presenta cáncer de mama en estadios más avanzados con grado nuclear mayor, carecen de receptores hormonales con mayor frecuencia y presentan diferentes tipos de mutaciones esporádicas del gen p53, por lo que tienen una tasa de mortalidad mayor en comparación con la que presentan las mujeres de raza blanca (Cotran *et al.*, 1999). Además se diagnostican más cánceres de mama en las mujeres negras jóvenes que en las mujeres blancas menores de 40 años.

5.4.1.2 Factores hormonales

El desequilibrio hormonal representado por el exceso de estrógenos endógenos que aparecen durante el ciclo menstrual está ligado al desarrollo del cáncer de mama. Esto se observa en los casos de tumores ováricos funcionales que elaboran estrógenos y su asociación al cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. También se ha observado un ligero incremento en el riesgo de cáncer de mama en las mujeres posmenopáusicas con niveles de estrógenos circulantes en el límite alto de la normalidad (Cotran *et al.*, 1999). La progresión tumoral del cáncer mamario, presenta un mecanismo autócrino, el cual ha sido asociado a señales moleculares secretadas por estas células; como factores del crecimiento (factor transformador de crecimiento-alfa/factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento de fibroblastos) e inhibidores de crecimiento (factor de crecimiento-beta; Cotran *et al.*, 1999). El factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina 1 y el factor de crecimiento transformante son capaces de inducir la fosforilación y la activación del receptor de estrógenos (RE) a través de señales que generan una cascada de eventos de fosforilación (Barrón, 1997). Los estrógenos regulan la producción de estas moléculas, por lo que la interacción entre los receptores hormonales de las células neoplásicas, las hormonas y estos factores de crecimiento autócrinos posiblemente están implicados en la progresión de cáncer de mama (Cotran *et al.*, 1999).

Por esto, la progresión del cáncer se puede medir con el RE de las células de la glándula mamaria, ya que su estimulación mediante hormonas esteroideas activa la transcripción de algunos genes encargados del crecimiento, proliferación y diferenciación. Esta regulación está medida por la unión de las hormonas con receptores específicos,





formando un complejo receptor-ligado activo que migra al núcleo y reconoce e interactúa con secuencias genómicas específicas localizadas río arriba del gen o dentro de genes a activar (elementos de respuesta a esteroides o ERE (Barrón, 1995; Dong, 1999).

5.4.2 Factores pronósticos clásicos del cáncer de mama

Las características del tumor de mama hace que sea necesario disponer de marcadores pronósticos que establezcan un índice de agresividad tumoral y sean capaces de predecir la evolución clínica de la enfermedad. Dentro de los factores pronósticos del cáncer de mama están: el tipo de cáncer, el subtipo histológico, los rasgos morfológicos como el tamaño tumoral, el grado y la afectación ganglionar, presencia de invasión del espacio vascular. Además de los factores pronósticos clásicos en cáncer de mama, algunos marcadores han sido asociados a determinados pronósticos, y se revisan de manera rutinaria. Algunos marcadores moleculares como la expresión de los receptores hormonales y de factores de crecimiento, la acumulación de p53 mutado; y otros rasgos como la proliferación celular, fase del ciclo celular, angiogénesis, contenido en DNA son considerados como una excelente herramienta para determinar un pronóstico y establecer el tratamiento más adecuado (Ross *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2004). Sin embargo, una de las principales limitaciones con los marcadores tumorales en cáncer de mama se debe a que dichos marcadores moleculares pueden encontrarse elevados en pacientes con procesos benignos y por otro lado no se encuentran en altos niveles en todos los pacientes con cáncer, especialmente en los estadios tempranos. Algunos autores consideran que para aceptar un marcador concreto como verdadero “positivo”, debe estar elevado sobre el nivel establecido como normal y al repetirlo 30 días después debe de haberse elevado $> 25\%$ (Colomer *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1995; ASCO, 1996). Los indicadores pronósticos clásicos mas frecuentes en el cáncer de mama como por ejemplo el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico y el estado de los ganglios linfáticos son algunos de los más importantes indicadores pronóstico del tumor de mama (King *et al.*, 2004; Almasry & Hamad, 2005). Algunos ejemplos de indicadores pronósticos clásicos en el cáncer de mama se exponen en la Tabla II.





Tabla II. Indicadores pronósticos clásicos		
Factores Pronósticos	Buen Pronóstico	Mal Pronóstico
Tamaño	<1 cm	>5 cm
Extensión Local	Ausente	Presente
Grado Nuclear	Bajo	Alto
Receptores Hormonales: Estrógeno (RE) Progesterona (RPg)	RE+, RPg	RE-, RP-
Ganglios Axilares	Tumor -	Tumor +

5.4.3 Marcadores tumorales en el cáncer de mama

Debido a la alta incidencia del carcinoma de mama y a las limitaciones de los parámetros clásicos de pronósticos, ha sido importante establecer factores pronósticos adicionales que permitan separar a los pacientes en grupos de acuerdo al riesgo de recurrencia y al tipo de terapia, entre otros parámetros (Yañez, 2006).

Los marcadores moleculares se expresan o se sobre-expresan debido a las alteraciones de las células tumorales y sus principales aplicaciones consisten en el diagnóstico, monitoreo, clasificación, estadificación, localización, pronóstico y seguimiento.

En cáncer de mama se expresan una serie de marcadores que presentan un importante valor pronóstico, el más ampliamente estudiado ha sido el Receptor de Estrógeno cuya positividad se relaciona con un mejor pronóstico y respuesta a la terapia estrogénica. Por otra parte, también se considera a la proteína Her2/Neu en la determinación del tratamiento como en el pronóstico, pues su presencia indica la posible respuesta al tratamiento (Yañez, 2006).

El cáncer de mama también expresa receptores de andrógenos, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina y somatostatina (Volpi *et al.*, 2000). Algunos factores de crecimiento han sido utilizados como blancos terapéuticos (Donegan, 1992; Hadden, 1995). El receptor de estrógenos alfa (RE- α) es el marcador molecular que se determina comúnmente en los centros de salud, clasificando a los carcinomas mamarios en RE- α positivos o negativos. Los pacientes positivos a RE tienen mayor supervivencia, la expresión de RE- α es muy utilizada como factor predictivo de respuesta a la terapia endocrina. Un porcentaje elevado de los pacientes con tumores a RE- α (tumores que muestran un crecimiento dependiente de estrógenos) responden a la terapia





con antiestrógenos como el tamoxifen, el cual tiene una estructura semejante al estrógeno y por lo tanto interrumpe la función del receptor, porque la unión de este al RE- α , reprime la activación transcripcional del genes blancos del receptor relacionados con el crecimiento de las células tumorales (Nilsson & Gustfsson, 2000; Van Dijik *et al.*, 2000). El segundo marcador mas común en la investigación de cáncer de mama es el antígeno carcinoembrionario (CA) 15.3 y 27.29, y otros, en niveles séricos; y aunque no han probado ser lo suficientemente sensibles para la detección temprana, se utilizan durante el seguimiento del tratamiento (Ross *et al.*, 2003).

Un marcador molecular ampliamente conocido es la proteína p53 mutada. En cáncer mama, se observa una mutación e inactivación del gen supresor de tumor p53, que produce la sobre-expresión de una proteína mutada sumamente estable. Esta proteína se observa en el 30 a 50% de los carcinomas mamarios, y dicta mal pronóstico pues se asocia a agresividad y recaída del cáncer.

Otros marcadores revisados clínicamente son la proteína Ki67, antígeno nuclear presente en células proliferantes cuya positividad mayor o igual a 20% se asocia a mal pronóstico; y la Bcl-2, asociada con la interrupción de la muerte celular programada, aunque asociada a un mejor pronóstico (Yamashita *et al.*, 2004; Yañez, 2006).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, también llamado *c-erb-B-1* o HER-1) se ha encontrado amplificado, mutado o sobre-expresado en un 67 a 90% de numerosos casos clínicos; pero su uso como factor pronóstico no está estandarizado y no se utiliza como rutina aún. Por otra parte, la amplificación y sobre-expresión del gen *HER-2/neu* y su proteína se ha identificado en un 10 a 34% de los cánceres mamarios invasivos, y se ha asociado su amplificación o sobre-expresión a un mal pronóstico en canceres mamarios con y sin implicación de nódulos linfáticos. El dominio extracelular de esta proteína puede ser liberado a la circulación y se ha detectado por ELISA en el 45% de los pacientes con cáncer de mama que presentan metástasis (Esteva *et al.*, 2005). Los pacientes positivos a HER-2 muestran resistencia a la terapia hormonal. Varios estudios han reportado que los tumores que sobre-expresan HER-2 fueron resistentes al tamoxifen independientemente de la expresión del RE y de otras variables de mejor pronostico (Livingston & Esteva, 2001). Se han estandarizado técnicas inmunohistoquímicas, de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para su detección y se ha desarrollado terapia de anticuerpos antiHER-2/neu (trastuzumab) para el tratamiento de pacientes con este receptor (VEGF; Ross *et al.*, 2003).

Otro marcador molecular importante es la ciclina D1 (*PRADI* o Bcl-1, en el cromosoma 11q13) asociado en 20% de los casos clínicos de cáncer mamario y se ha ligado





a la transición de *in situ* a ADI. Otro regulador del ciclo celular es el p27, el cual se une e inactiva a las ciclinas dependientes de quinasas (CDK's) y se asocia su baja expresión a un mal pronóstico en la mayoría de las pacientes. La Skp2 interviene en la degradación de p27 vía ubiquitina, y se ha encontrado su sobre-expresión en carcinomas mamarios ER-negativo/HER2-negativos (Ross *et al.*, 2003).

Otros marcadores potenciales son la mamaglobina y la maspina, y el uso de metodologías de amplificación con PCR con técnicas de captura celular con cuentas inmunomagnéticas, proteómica, aspiración de conducto de pezón, y el FISH se consideran las nuevas herramientas a estandarizarse para el diagnóstico molecular (Ross *et al.*, 2003). Entre los marcadores moleculares que actúan a la par o más tempranamente, que los anteriores están los genes HOX, los cuales participan en los mecanismos genéticos de la identidad de tejido y la organogénesis.

5.5 Genes homeóticos

Los genes homeóticos descubiertos en la década de los ochentas en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, permiten la regulación del control maestro de la morfogénesis y la diferenciación celular durante el desarrollo del cuerpo de los organismos multicelulares así como el mantenimiento de los tejidos y órganos en el adulto. La clave para la identificación de los genes involucrados en el control genético del desarrollo la dieron mutaciones espontáneas en *Drosophila melanogaster*, en donde se encontraron transformaciones que substituyen una parte del cuerpo por otra, como dos pares de alas a la vez de uno (Bithorax) o patas en lugar de antenas (Antennapedia). Los genetistas denominaron estos cambios como “transformaciones homeóticas” en base al término “homeosis”, que describe la transformación de un segmento por uno de estructura homóloga, y llamaron homeóticos a aquellos genes que portaran esta secuencia. Las transformaciones homeóticas fueron descubiertas desde inicios del siglo pasado por el grupo de H. Morgan y cols., estas aportaron la clave para la identificación de los genes maestros que regulan la especificación del plan del cuerpo (García-Bellido, 1977; Lewis, 1978).

El advenimiento de la Tecnología del DNA recombinante permitió clonar los genes homeóticos responsables de éstas mutaciones en el complejo Bithorax y Antennapedia (Complejo Homeótico o HOM-C) dando inicio al estudio de los mecanismos mediante los cuales éstos genes controlan el desarrollo (Karch *et al.*, 1985, Scott, *et al.*, 1983, Kuroiwa *et*





al., 1985). Como consecuencia, el aislamiento de los genes homeóticos en *D. melanogaster* inició una época dorada en este campo que ha permitido el mejor entendimiento de los mecanismos del control genético del desarrollo.

El locus del complejo Antennapedia (Antp) se extiende en una región grande del cromosoma (100 Kpb) con exones e intrones tan grandes como 60 Kpb. Experimentos realizados en Antp en el laboratorio de Walter Gehring y cols. demostraron que los genes homeóticos comparten un segmento de DNA de 180 pb altamente conservado denominado “Homeobox”, el cual codifica para una secuencia aminoacídica, denominada homeodominio (HD), de 60 residuos altamente conservados, y en consecuencia reconocen secuencias de unión al DNA muy similares mediante la hélice de reconocimiento (Gehring *et al.*, 1987; Gehring *et al.*, 1994).

Durante la última década, varios cientos de genes conteniendo el homeobox han sido aislados en organismos tan diversos que van desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo al hombre (Acampora *et al.*, 1989; Holland *et al.*, 1992; Sheperd *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1993; Wysocka *et al.*, 1989). Los homeodominios de anfibios y vertebrados superiores como el ratón y el hombre difieren en un solo residuo aminoacídico con Antp, que es el ortólogo en la mosca de la fruta. Esto demuestra la presencia de una fuerte presión evolutiva para conservar la secuencia de aminoácidos de los homeodominios, si consideramos que los vertebrados e insectos se separaron y evolucionaron independientemente por más de 50 millones de años. Por otro lado, la distribución co-linear de estos genes agrupados y distribuidos en el cromosoma de acuerdo a su expresión a lo largo del eje antero-posterior del plan del cuerpo (Figura 5), corroboran sin lugar a dudas su alto grado de conservación evolutiva (Gehring *et al.*, 1994; Grier *et al.*, 2005).

Los genes homeóticos en vertebrados están divididos en familias y subfamilias dependiendo del nivel de semejanza entre sus respectivos homeodominios. Se dividen en dos clases: genes Clase I organizados en cuatro complejos (HOXA, HOXB, HOXC y HOXD); y la Clase 2 o genes divergentes, en donde se encuentran *Pax*, *Msx*, *Irq* y *Dlx*, llamados de acuerdo a su respectivo ortólogo en *D. melanogaster* (*pair*, *muscle segment*, *iroquois* y *distal-less*, respectivamente; Abate-Shen, 2002; Fu *et al.*, 2003). La familia de genes de la Clase I es homóloga tanto funcional como estructuralmente al complejo homeótico (HOM-C) de *D. melanogaster*. Esta familia de 39 genes corresponde a la familia de “genes HOX” en mamíferos donde están organizados en cuatro complejos genómicos localizados en diferentes cromosomas, HOXA en 7p, HOXB en 17p, HOXC en 12p y HOXD en 2p, y cada uno de ellos comprende de 9 a 11 genes acomodados en una secuencia homóloga a la que tienen en el genoma de *D. melanogaster*.





Como se puede observar en la Figura 5 donde se muestra la relación entre los genes de los complejos *Antennapedia* (Ant-C) y *Bithorax* (Bx-C) de *D. melanogaster* y los genes HOX en vertebrados, además de la expresión de éstos en su patrón corporal (Favier & Dollé, 1997; Grier *et al.*, 2005).

Se sabe que la expresión de estos genes HOX por lo general esta restringida a células indiferenciadas o en estado de proliferación, mientras que la expresión de los genes homeóticos de la familia MSX regulan las interacciones mesénquimo-epiteliales, que controlan la diferenciación de los tejidos durante la embriogénesis (Abate-Shen, 2002).

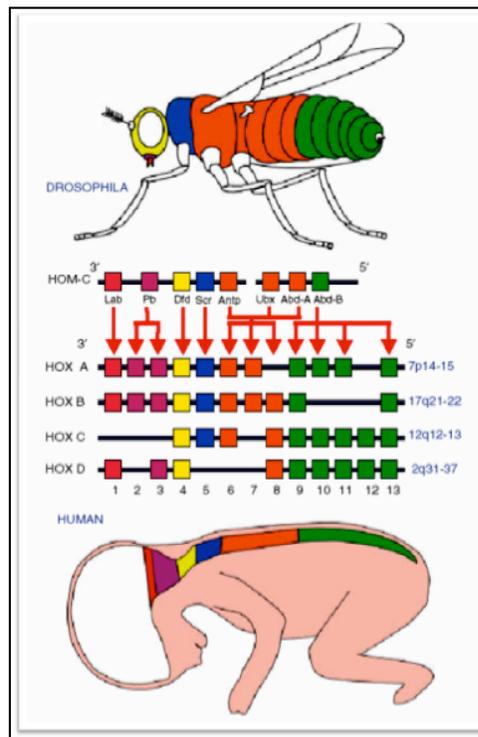


Figura 5. Expresión colinear de los genes homeóticos y HOX a lo largo de los ejes antero-posteriores (AP) y cráneo caudales en *Drosophila melanogaster* y vertebrados respectivamente. El desarrollo evolutivo muestra la integración en un solo cromosoma de los complejos *Ant-C* y *Bx-C*, que junto con duplicaciones y deleciones permitieron establecer los 39 genes HOX presentes en el ser humano. Se muestra la expresión a lo largo del eje AP tanto en *D. melanogaster* como en el humano (Grier *et al.*, 2005).

La relación entre el arreglo cromosomal de los genes homeóticos y la localización de su expresión fue establecida por Ed Lewis en 1978, quien determinó la expresión co-lineal en éstos genes de acuerdo a su posición en el cromosoma. Además, el patrón axial se



considera que puede ser el resultado de tres características de los genes HOX. El primero es que su expresión se da en bandas semi-definidas en el embrión, teniendo como ejemplo la expresión de HOXA11 y HOXA13 en las extremidades de los vertebrados. La segunda opción es que los genes del extremo 3' se expresan más en todo el eje antero-posterior (AP), mientras que los genes del 5' se restringen a las estructuras posteriores, siendo el "Código HOX" el que determina la estructura. El tercer caso es el de la prevalencia posterior, donde los genes del extremo 5' inactiva a los genes del extremo 3', determinando así la identidad de las estructuras (Grier *et al.*, 2005).

El papel de los genes HOX en la construcción de la organización del cuerpo humano es esencial, pero los mecanismos finos de expresión son todavía una pregunta fundamental para la biología del desarrollo (Alberts *et al.*, 2002).

5.5.1 Mutaciones en los genes HOX

Las mutaciones en los genes HOX provocan malformaciones en humanos, y en el caso de *D. melanogaster*, la mutación de un solo gen HOX dará lugar a fenotipos muy dramáticos como Ultrabithorax. En vertebrados, debido a sus cuatro copias de los genes de complejo HOX, ocurren transformaciones más "sutiles" en las que un segmento se asemeja más a tejidos anteriores, esto debido a la redundancia genética dada por la expresión de genes parálogos con los mismos patrones de expresión (Daftary *et al.*, 2006).

La relación entre el arreglo cromosomal y la localización de su expresión fue establecida por Ed Lewis en 1978, quien determinó dos tipos de mutaciones homeóticas, las llamadas pérdida de función o ganancia de función, en la forma corporal dependiendo de la posición en el grupo. Las mutaciones de los genes homeóticos por lo general llevan a transformaciones homeóticas del segmento más anterior en donde se exprese el gen, aun cuando se exprese en varios segmentos. Las mutaciones de pérdida de función por lo general resultan en el desarrollo de estructuras que se encuentran en segmentos más anteriores, mientras que las mutaciones de ganancia de función producen segmentos con estructuras encontradas en segmentos más posteriores. A este efecto se le denominó "dominancia posterior" o "prevalencia posterior" y es el resultado del patrón de expresión traslapada de los genes del HOM-C. Esto se observa en ratones sin los genes del grupo C, los cuales mostraron anomalías estructurales menores, aunque murieron de disfunción pulmonar al nacer (Suemori & Noguchi, 2000).





La sinpolidactilia fue la primera malformación asociada a una mutación por parte del gen HOXD13 (Sayli *et al.*, 1995). Esta patología se caracteriza por la malformación heredada de los miembros torácicos y pélvicos, que representan ausencia y/o reproducción de falanges u orjeos. Además, la expresión de HOXD13 en el tubérculo genital produce la hispospadias (malformación en la que la uretra no alcanza a llegar hasta el glande (Goodman, 2002).

Las mutaciones en HOXA13 se asocian con el síndrome “mano-pie-genital” (hand-foot-genital syndrome). La ausencia congénita del pene o del clítoris también, probablemente se deba a las mutaciones en los genes HOXA13 y HOXD13 (Carlson, 2005). Una mutación en HOXD10 se asocia con el talo vertical congénito y la enfermedad dental de Charcot-Marie. La expresión alterada de genes HOX, en especial de HOXA11 y HOXC11 es provocada por la exposición *in útero* al ácido valproico que produce el síndrome de valproato fetal, que se asocia a un mayor riesgo de espina bífida, y otras anomalías como defectos del corazón, paladar hendido y anomalías craneofaciales y en las extremidades (Grier *et al.*, 2005).

En ratones homocigotos para mutaciones “knockout” en los genes *hoxa10*, *hoxc10* y *hoxd10* (seis alelos mutantes), las vértebras lumbares presentaron proyecciones de costillas transformadas en vértebras torácicas. Por lo tanto, los genes del grupo HOX10 están involucrados en la restricción de la morfogénesis de las costillas. Los ratones con un alelo tipo silvestre y cinco alelos mutantes sólo presentaron un par de costillas en la primera vértebra lumbar, mientras que los que tenían dos alelos tipo silvestre y cuatro alelos mutados presentaron una morfología esquelética normal, indicando que la morfogénesis vertebral depende de una regulación cuantitativa más que cualitativa como en *Drosophila* (Wellik y Capecchi, 2003).

También se ha investigado extensamente la función de los genes HOX en la hematopoyesis, encontrándose un patrón característico de estos genes en cada linaje y etapa de diferenciación de estas células. Utilizando estrategias de sobre-expresión y ratones “knock-out” se ha encontrado que disrupciones en la expresión de los genes HOX conducen a cambios en la progenie celular. Como el papel de HOXA5 que llevó a la expansión de las células progenitoras mieloides, y a la reducción de la diferenciación eritroide; por el contrario, hubo una proliferación de la población eritroide e inhibición de la hematopoyesis granulocítica/monocítica al inhibir la expresión de HOXA5 (Crooks *et al.*, 1999). A la par de estos experimentos, varios grupos de investigadores asociaron el gen HOXA9 con el desarrollo de células T, donde se observó una disminución de éstas células al bloquear la expresión de éste gen (Izon *et al.*, 1998, Lawrence *et al.*, 1997).





5.5.2 Los genes HOX en patologías neoplásicas

Los genes HOX activan programas de genes efectores que llevan a cabo cambios acorde a la señal recibida. Estos genes regulan muchos procesos celulares, como la adquisición y mantenimiento espacio-temporales de las células, el establecimiento de la identidad celular, el control del crecimiento y la proliferación celular debido a su interacción con los mecanismos del ciclo celular y apoptosis. Todos estos procesos son muy importantes tanto para la morfogénesis normal de los tejidos como para el desarrollo de neoplasias (Cillo, 2006).

El potencial oncogénico de los genes HOX fue observada por primera vez en la leucemia donde se documentó la sobre-expresión de *hoxa9* y *Meis* (gen del tipo Abd-B) simultáneamente en ratones sinérgicos donde se llevó al desarrollo de leucemia mieloide oligoclonal aguda en menos de tres meses, pero no se obtuvo este resultado con la sobre-expresión de los genes por separado (Kroon *et al.*, 1998). Este fenómeno podría ser debido a la interacción de MEIS en la transportación al núcleo de la homeoproteína Hoxa9 (Kiritto *et al.*, 2004). A partir de estos estudios se concluyó que muchos de los genes HOX eran potencialmente leucemogénicos y se comenzó a analizar el papel de los genes del desarrollo en otros tipos de cáncer, basados en la hipótesis de que los genes que se expresan durante la embriogénesis, pero no en tejido adulto pueden re-expresarse en tejido neoplásico. Estos descubrimientos dieron la pauta para el análisis del papel de los genes HOX en cáncer, específicamente en leucemias (Grier *et al.*, 2005). Abate-Shen llega a conclusiones similares con respecto a que en los tumores sólidos malignos la expresión aberrante de los genes HOX en cáncer puede clasificarse en tres categorías. Estas alteraciones se presentan en distintos órganos del ser humano las cuales se pueden observar con más precisión en la Tabla III.

1. Los genes homeobox pueden re-expresarse en las células tumorales que se derivan de células embrionarias en las que un gen HOX en particular se expresa durante el desarrollo. La mayoría de los genes HOX desregulados en cáncer caen dentro de esta categoría, como se ha demostrado en cáncer de riñón, mama y cerebro, entre otros (Tabla III).

La ganancia de función de algunos genes homeóticos ha promovido el desarrollo del fenotipo canceroso en líneas celulares en cultivo. En general, la expresión de estos genes que se “encienden” en el cáncer se restringe a células indiferenciadas o en estado de proliferación, ambas características de las células tumorales. Se cree que





esta actividad esta dada no por homeoproteínas mutantes, sino por homeoproteínas normales que se expresan en un contexto equivocado. Esto también lleva a pensar que los genes son selectivos respecto al tipo de tumor en el que han de expresarse. En otras palabras, el resultado funcional de la oncogénesis puede variar dependiendo del tipo de célula en que se expresa el gen homeótico.

2. Los genes homeobox pueden expresarse en células cancerosas derivadas de aquellas en las que el gen no se expresa normalmente durante el desarrollo, como en el caso de PAX5. Este gen se expresa en el meduloblastoma, pero no en el cerebelo, de donde se deriva este tumor. Siendo que existen muy pocos ejemplos de este tipo de desregulación, se piensa que esta expresión “novedosa” de los genes homeóticos es más una excepción que una regla (Tabla III).
3. Los genes homeobox pueden estar sub-regulados en células cancerosas derivadas de tejidos en los que el gen se expresa normalmente en el estado diferenciado. Entre los ejemplos de esta categoría se incluyen la pérdida de expresión de CDX2 en el cáncer de colon y NKX3 en el cáncer de próstata. Existen ahora numerosos casos en que la pérdida de expresión de un gen está asociado con la tumorigénesis. Estos genes pertenecen a familias que suelen expresarse en tejido completamente diferenciado, como CDX y NKX. Un ejemplo notable es la pérdida de función de *HOXA5*, asociada al cáncer mamario. La mutación del promotor de este gen, y por lo tanto, la pérdida de la expresión de la proteína se relacionan con la pérdida de expresión de p53 (Tabla III).

Otros investigadores han analizado la relación entre la expresión alterada de genes HOX con cambios en procesos celulares, puesto que la transformación neoplásica y su mantenimiento requiere un estado celular de proliferación anormal, donde la diferenciación no se realice de manera apropiada y presenta una mala respuesta apoptótica. Existen numerosos ejemplos en que las actividades oncogénicas de una homeoproteína se atribuyen a sus efectos indeseados en la regulación del ciclo celular, y que además reflejan una extensión errónea de sus funciones embrionarias normales. Siendo que los genes HOX juegan un papel importante en el estado basal de la célula, no es sorprendente que los cambios en la expresión de estos genes en los tejidos malignos afecten procesos tales como la proliferación, diferenciación y muerte celular.



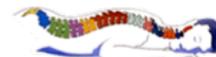


Tabla III. Expresión alterada de los genes HOX en el cáncer		
Tipo de cáncer	Gen afectado	Efecto
Mamario	HOXA1	Se expresa en tejido neoplásico, pero no en tejido normal. Induce la transformación oncogénica y promueve la supervivencia de las células cancerosas.
	HOXA5	Presenta pérdida de su expresión en más del 60% de los cánceres mamaros, con una consecuente pérdida del RNAm y la proteína de p53.
	HOXB13	Su expresión ectópica en la línea celular MCF-7 sugiere que pueden contribuir a la proliferación y metástasis tumoral.
Colorectal	HOXB6, B8, C8 y C9	Se encuentran sobre-regulados, como una marcada disminución en CdxI.
Pulmón	Múltiple	Genes que se encuentran en el cáncer de células pequeñas, pero no en tejido normal. Expresión de diversos genes que recapitulan el patrón encontrado en el tejido pulmonar embrionario.
	HOXA7, A10, B9, C5 y D13	Se encuentran sobre regulados en la mayoría de los casos de cáncer pulmonar de células pequeñas (A7, C5 D13), y sobre regulados con asociación a bajos niveles de WNT7 a (A10, B9).
Melanoma	HOXC10, C11 y C13	La expresión de VLA e ICAM-I están relacionados inversamente con la expresión de los genes HOX C caudales, y con potencial metastático.
Próstata	HOXC8 y otros genes del grupo C	Su sobre-expresión en el cáncer de próstata está relacionada con la dediferenciación de los tumores.
Riñón	HOXB5 y B9	Se encuentran sub-regulados en comparación con el riñón normal.
Vejiga	HOXC4, C5 y C6	Se encuentran sobre-regulados en comparación con el urotelio normal.
Tiroides	Múltiple	Existe una desregulación de los genes de la familia Abd-B.
Ovario	HOXA7	No se expresa en el epitelio ovárico normal, pero sí en el tumoral de ovario diferenciados.
Endometrial	HOXB13	Su sobre-expresión en células de cáncer endometrial es un indicador de la invisibilidad de éste cáncer.
	HOXA1	Se encuentra sobre-regulado con respecto al normal.

Tomado de Raman *et al.*, (2000), Zhao *et al.*, (2004), Grier *et al.*, (2005), Samuel *et al.*, (2005), Ma *et al.*, (2006) y Cillo (2006).

Proliferación celular

Un incremento en la expresión de hormona de crecimiento humana (hGH) esta asociada con crecimiento neoplásico en células epiteliales mamarias. Zhang *et al.*, en el 2003, encontraron que la producción de esta hormona en células mamarias cancerosas incrementaba la expresión y actividad transcripcional de HOXA1. Ésta sobre-expresión resultó en una regulación positiva de Bcl-2 y un incremento en el número total de células. HOXA1 también disminuía la respuesta apoptótica de las células cancerosas, además que incrementaba la proliferación celular independiente del anclaje. Estos descubrimientos





indican que el incremento en la proliferación, la disminución de respuesta apoptótica y un aumento en el potencial metastático pueden estar mediados, en parte, por HOXA1. HOXC10 es dependiente del tipo celular y su expresión también está relacionada con la proliferación celular (Grier *et al.*, 2005).

Diferenciación celular

La malignidad está asociada con la falta de las células para diferenciarse, y varios genes homeóticos están relacionados con la diferenciación terminal. La sobre-expresión de algunos genes HOX está asociada con la pérdida de la diferenciación, como es el caso de HOXC8 en el cáncer de próstata humano, además, se sugiere que ese gen está involucrado en la adquisición de las características invasivas y metastáticas.

Apoptosis

Raman *et al.*, en el 2000, encontraron niveles bajos del RNAm de p53, una proteína que juega un papel importante en la muerte celular, en una gran cantidad de tumores mamarios, y notaron una pérdida coordinada de p53 y el RNAm de HOXA5 en tumores y líneas celulares de cáncer mamario.

En 16 de 20 tumores negativos para p53 se encontró que la región promotora de HOXA5 estaba metilada, lo que llevó a los autores a concluir que una falta de expresión de HOXA5 puede ser responsable de la pérdida de expresión de p53 (Grier *et al.*, 2005).

Receptores Hormonales

Algunos genes HOX podrían interactuar con la señalización de los receptores hormonales, como es el caso de HOXC8, que se encontró sobre-regulado en el cáncer de próstata y que suprime la señalización de los receptores de andrógenos, o bien el caso de HOXB13, que se sabe que interactúa con los receptores de estrógeno (Ma *et al.*, 2006), o el caso de HOXA5, que es un regulador positivo de los receptores de progesterona (Raman *et al.*, 2005).





5.6 Genes HOX en el desarrollo mamario

5.6.1 Desarrollo y ciclo mamario

El epitelio de la glándula mamaria se deriva del ectodermo; la primera diferenciación deriva en su distinción frente a otros tejidos epiteliales, como la piel, folículos (del cabello), u otros tejidos derivados. Esta diferenciación ocurre en, al menos dos grandes etapas. La primera etapa inicia a los 10 días de gestación (E10), con el establecimiento de las bandas mamarias; dos líneas anchas derivadas del epitelio que corren sobre el eje antero-posterior, desplazadas del centro simétricamente. Estas bandas representan la primera evidencia morfológica del patrón mamario formándose y diferenciándose (Lewis, 2000).

La segunda etapa ocurre cerca del E11, con la delimitación de la región del pezón: el epitelio mamario forma un disco en forma de lente que comienza a asociarse con el mesénquima mamario condensado y subyacente. El epitelio mamario continúa creciendo

hasta formar una yema mamaria en forma de bulbo, la cual se alarga e invade el mesénquima condensado. La identidad celular del epitelio mamario se establece firmemente desde la etapa de yema E12.5, y se evidencia al ser posible el trasplante de una presunta glándula mamaria al cojín de tejido adiposo y regenerar, por sí mismo, las ramificaciones de los conductos. El desarrollo mamario presenta una fase lineal, en donde se establece la identidad como glándula mamaria, y una fase cíclica, en la cual se desarrolla la función productora de leche en cada embarazo, regresando a un estado de madurez. El ciclo mamario se esquematiza en la Figura 6.



Figura 6. El ciclo mamario. El ciclo mamario menstrual se establece a partir de la madurez de la glándula mamaria en cada embarazo se presenta un ciclo de crecimiento, diferenciación e involución de acinos lobulillares o alvéolos (Lewis, 2000).





5.6.2 Expresión de los genes HOX en las diferentes fases del desarrollo mamario

5.6.2.1 Fase lineal

El esquema del desarrollo mamario y la expresión de los genes HOX se observa en la Figura 7. Durante la embriogénesis, los genes HOXB9 y HOXD9 se expresan en el tejido mesenquimático mamario que rodea al bulbo epitelial, sugiriendo un papel en la condensación del mesénquima o en la modulación de interacciones epitelio-mesenquimáticas durante el desarrollo temprano de la glándula mamaria (Lewis, 2000). Mientras la yema mamaria se alarga, llega a un segundo mesénquima- el mesénquima precursor del cojín de tejido adiposo- y comienza a ramificarse para formar la glándula rudimentaria del neonato. Antes o durante esta transición actúan una gran cantidad de genes para permitir un mayor desarrollo o para controlar el establecimiento del dimorfismo sexual de la glándula mamaria (como el *Lefl*, *PThRP*, *PPRI*). Experimentos de recombinación de tejido indican que el mesénquima mamario y el mesénquima del tejido adiposo afectan el crecimiento del epitelio mamario de muy diferentes maneras, sugiriendo diferencias fundamentales en su identidad y propiedades biológicas con respecto a la interacción de tejidos. Se desconoce como se establecen estas diferencias y en la transición a la siguiente etapa es crítica la presencia de *Msx-2* (Lewis, 2000).

Del nacimiento a la pubertad, la glándula mamaria se mantiene rudimentaria y sin crecimiento notable. Durante la pubertad, las hormonas del ovario estimulan el alargamiento rápido e invasivo de los conductos, liderado por el crecimiento de una estructura llamada yema terminal final, la cual consiste de cuatro a seis cepas de células no diferenciadas y una capa de células que las rodea. Estas células se diferencian en células epiteliales luminarias (que constituirán diferentes tipos celulares) y células miopiteliales, respectivamente, mientras que forma el conducto subyacente. No se conoce como se marca el destino celular del resto de los tipos celulares individuales. Aquí el gen *Alx4* se enciende en estroma periductal, y HOXB7 estará encendido en el epitelio ductal hasta la fase temprana del embarazo, junto con *Msx1*; *Msx2* desaparecerá del estroma periductal hasta la mitad del embarazo. HOXD4 comienza a actuar en esta etapa, junto con HOXD9 y HOXD10, en el epitelio ductal. HOXD10 está presente también en las yemas terminales y el estroma periductal. Se ha encontrado que HOXD9 se expresa en el desarrollo post-natal y aumenta su expresión en los fibroblastos periductales y el epitelio ductal del periodo previo al embarazo, disminuyendo su expresión en estas células durante el embarazo (Lewis, 2000).





Al llegar a los límites del cojín de tejido adiposo en la madurez del conducto, cesa su alargamiento y la yema terminal se revierte a un sistema ramificado de yemas diferenciadas. Estos conductos se mantienen en reposos hasta que ocurre el embarazo y se piensa que se mantiene este control por medio de miembros de la superfamilia de los factores transformadores de crecimiento- β (Lewis, 2000).

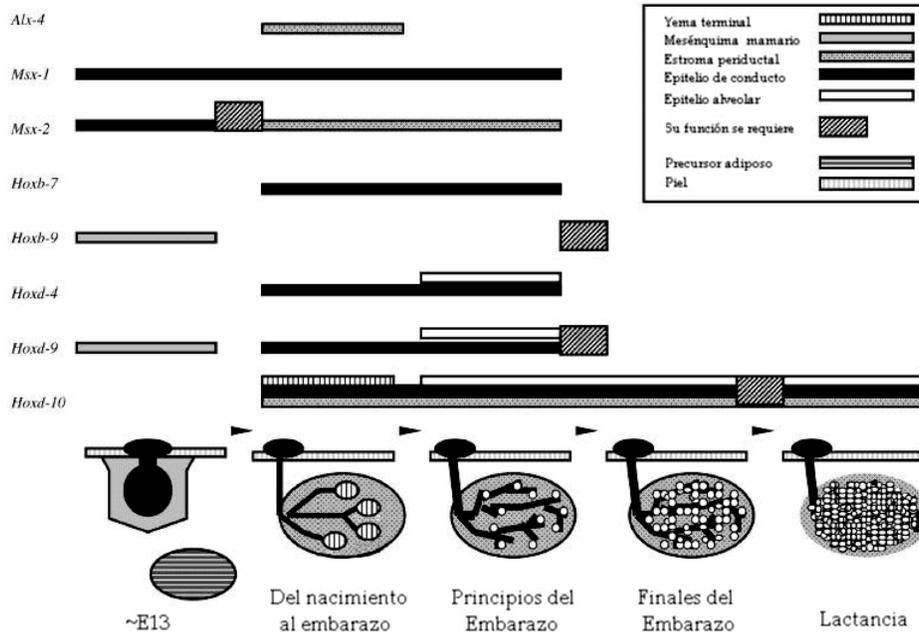


Figura 7. Papel de los genes HOX en el desarrollo mamario. Los genes HOX se encuentran expresados en un tejido y tiempo específicos. Los genes HOXB7, HOXD4, 9 y 10 se expresan del nacimiento a principios del embarazo, en el epitelio ductal. HOXD10 se expresa en las yemas terminales y continúa expresándose durante el embarazo y la lactancia en el epitelio alveolar, además de expresarse en el estroma periductal. La función de los genes *Msx-2*, HOXB9, D9 y D10 se requiere para cambiar entre etapas (Lewis, 2000).

5.6.2.2 Fase cíclica

Los cambios hormonales que ocurren en el embarazo inicial una fase cíclica del desarrollo, en la que hay transiciones críticas en la morfología glandular, de predominantemente ductal a predominantemente lóbulo-alveolar. Las células progenitoras lóbulo-alveolares, localizadas dentro de los conductos, proliferan para formar yemas alveolares, que se diferencian en alvéolos. Cerca de la mitad del embarazo, el epitelio alveolar adquiere la capacidad de producir proteínas lácteas (Etapa 1 de la transición a



lactogénesis) pero la función secretora está inhibida. En el parto, se detiene la inhibición de la secreción y estas células comienzan a secretar grandes cantidades de leche (Etapa 2 de la transición a lactogénesis). Al ocurrir el destete, la secreción de leche cesa y la mayoría de las células alveolares llegan a la apoptosis (muerte celular programada) mientras que una población de células epiteliales residuales se remodelan para formar las ramificaciones de los conductos y esperar el siguiente embarazo (Lewis, 2000).

En el inicio del embarazo, en el epitelio alveolar se expresan los genes HOXD4, HOXD9 y HOXD10. La transición a la etapa 2 parece depender de HOXB9 y HOXD9. Además, HOXD9 mostró una mayor expresión en epitelio alveolar en desarrollo, en comparación con el conducto subyacente, reafirmando su papel en la diferenciación alveolar durante el embarazo. En esta etapa del embarazo y durante la lactancia fue posible encontrar a HOXD10 en el epitelio alveolar, el epitelio de conducto y del estroma periductal, por lo que su expresión es crítica para la transición entre estas dos fases. Estos cambios están dados por señales hormonales y factores de crecimiento, pero la manera en que las células epiteliales y del estroma están programadas para responder y mantener el estado diferenciado se desconoce (Lewis, 2000). Además, Chen y Capecchi en 1999 demostraron que los genes HOXA9, HOXB9 y HOXD9 influyen en la proliferación y ramificación del epitelio mamario en respuesta al embarazo.

La expresión de HOXD10 se demostró en tejido epitelial y estroma por hibridación in situ, con altos niveles en epitelio alveolar en secreción. Esto indica que puede tener un papel importante en la diferenciación lóbulo-alveolar o en la transición de embarazo a lactancia. Al inhibir la expresión de este gen, la lactancia se vio afectada en un porcentaje significativo de animales mutantes homocigotos en los que las glándulas de los animales afectados no mostraron la expansión de los alvéolos (Lewis, 2000).

El papel de los genes HOX en el desarrollo mamario se hace notar al detectar su expresión en el epitelio mamario y/o en el estroma periductal donde son dependientes del nivel de estrógenos. Estas interacciones son críticas para el desarrollo y función de la glándula mamaria, y tienden a estar alteradas en la progresión neoplásica (Lewis, 2000).

5.7 Expresión alterada de los genes HOX en cáncer mamario

La expresión de los genes HOX en neoplasias mamarias es compleja debido a que existen distintos tipos de neoplasias y distintas líneas celulares modelo. La transformación neoplásica y su mantenimiento depende de la inmortalización- dada por alteraciones en la





regulación del ciclo celular, proliferación, y su muerte celular-, de la anaplasia-perdida de la diferenciación celular, expresión de nuevas proteínas que permiten invasividad-, y de la angiogénesis-formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan al creciente tejido (Kufe *et al.*, 2003). Muy pocos estudios han abordado la alteración de la expresión de los genes HOX en los procesos de transformación oncogénica, sin embargo se sabe que los genes HOX juegan un papel fundamental en la determinación del programa molecular del tejido mamario, el cual está severamente alterado en los procesos de cáncer.

Dentro de los 39 genes HOX analizados en los tejidos normales, tejidos benignos y cáncer mamario se encontraron niveles alterados de expresión en los siguientes genes:

El aumento de la expresión de HOXA1 ha sido asociada a cáncer de mama (Friedmann *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003; Water & Conway-Campbell, 2004), aunque los resultados obtenidos por Cantile y cols. en el 2003 y Makiyama y cols. en el 2005 no muestran su presencia en la mayoría de las muestras tumorales, por lo contrario, se observa disminución en la expresión de HOXA1. Además, la expresión diferencial de los distintos transcritos de HOXA1 generados por splicing alternativo no ha sido extendidamente revisada, lo cual conduce a determinar cuál o cuáles transcritos se expresan de manera alterada en cáncer de mama.

Por otra parte, la pérdida de la expresión de HOXA5 también se ha correlacionado con la pérdida de p53 (Raman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004), y aunque Cantile y col. en 2003 no detectaron HOXA5 en tejido mamario normal, Makiyama y cols. (2005) detectaron una disminución significativa en carcinomas con respecto a tejidos tumorales benignos.

En relación con HOXD3, este gen muestra mayor expresión en tejido normal que en cáncer, de acuerdo a Svingen y Tonissen (2003) y Makiyama y cols. (2005), aunque también se ha encontrado asociado a cáncer de mama y otros tipos de cáncer (Cantile *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 2002).

Con respecto a *hoxd4* y *hoxd8* mostraron un patrón de expresión similar en la glándula mamaria murina, expresándose en tejido normal y no expresándose en tejido tumoral (Friedmann, 1995) y encontrándose una diferencia significativa en su expresión en tejido normal mamario humano y tejido con cáncer (Makiyama *et al.*, 2005). Asimismo, el apagado de HOXD4 es apoyado por el silenciamiento mediante mutación del gen HOXD4 en células mioepiteliales de conductos mamarios con cáncer *in situ* con respecto a células mioepiteliales normales (Hu *et al.*, 2005). Sin embargo, HOXD4 ha sido encontrado, de manera contraria, encendido en tejido con cáncer y apagado en tejido normal mamario, y HOXD8 se encontró tanto en tejido normal como con cáncer (Cantile *et al.*, 2003).





HOXD10 se expresa en tejido normal mamario y no presenta expresión en neoplasias (Friedmann, 1995; Lewis, 2000, Makiyama *et al.*, 2005), aunque Cantile y cols. en 2003 encontraron su expresión en cáncer y no detectaron HOXD10 en tejido normal. Debido a la controversia existente por Cantile y cols. (2003), la expresión de estos genes necesita ser aclarada.

En cuanto a la variabilidad en la expresión de HOXB2 y B5 en tejido mamario, con un trabajo con un mayor número de muestras se podría esclarecer mejor el patrón de expresión de estos genes. HOXB2 se ha descrito tanto encendido como apagado en tejido normal mamario, mientras que se ha reportado encendido en cáncer. Se ha descrito la expresión de HOXB5 en tejido normal de mama, pero su presencia en tejido maligno es variable (Svingen & Tonissen, 2003; Cantile *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003; Makiyama *et al.*, 2005).

La investigación realizada por Webb y cols. en el 2007 realizando la amplificación mediante RT-PCR de los genes HOXA1, HOXB2, HOXD3, HOXD4, HOXB5, HOXD10 y HOXA11 donde los genes HOXA1 transcrito corto y transcrito medio, A5 y D3 fueron detectados principalmente en tejido normales y fibroadenomas, con una alta correlación entre su expresión y la ausencia de malignidad. La expresión de los biomarcadores moleculares RE, RP, Ki67, p53m y Her2/neu, analizados en 15 muestras de adenocarcinomas ductales infiltrantes, fue independiente de la expresión de los genes antes mencionados.

5.7.1 HOXB13

HOXB13 es un gen Homeobox correspondiente a la familia de “genes HOX” localizado en el lado más próximo del 5’ del segundo complejo (HOXB) en el cromosoma 17p. Es un miembro de la familia AbdB cuya expresión perdura a través de la organogénesis y continúa en la próstata madura del ratón adulto (Sreenath *et al.*, 1999; MacMullin *et al.*, 2009). Zeltser y cols. en 1996 determinaron la secuencia del gen HOXB13 parálogo para humanos y ratones. Una combinación de mapeo genético y físico demostró que HOXB13 era un nuevo gen que se encontraba localizado aproximadamente a 70Kb de *hoxb9* en la misma orientación de transcripción que el resto del grupo B.

En embriones de ratones, *hoxb13* mantiene colinearidad temporal y espacial en la mayor parte del eje del cuerpo, estando expresado en fases más tardías del desarrollo en la





región bulbo caudal y posteriormente, en el cordón espinal, tracto digestivo y tracto genitourinario.

Entretanto, no se expresa en miembros y bulbos genitales. Este gen se encuentra relacionado o involucrado en el proceso de cicatrización, aunque el mecanismo no se encuentra bien estudiado, se ha encontrado que la sobre-expresión de *hoxb13* produce varias anormalidades fenotípicas en tejido epidérmico bien diferenciado en modelos murinos adultos, mientras que en modelos murino fetales se ha encontrado que *hoxb13* tiene funciones proapoptóticas y antiproliferativas durante el desarrollo de la médula espinal caudal y de las vértebras de la cola (Mack *et al.*, 2005).

Se afirma que alteraciones de dos genes HOX localizados en las regiones 9-13 principalmente de los complejos A y D, son frecuentemente relacionados con alteraciones en las extremidades de algunos miembros humanos. Tal es el caso de la sinpolidactilia que es el resultado de las expansiones polialaninicas provocadas por repeticiones imperfectas de un trinucleótido en el exón 1 del gen HOXD13 resultando en la inserción de 15 residuos de alanina en la región N-terminal de la proteína provocando la pérdida de función de la misma. Consecuencias patológicas similares fueron identificadas para un mismo tipo de alteraciones en el gen HOXA13 (Cazal, 2004).

La pérdida de función de *hoxb13* esta fuertemente asociada con el crecimiento de las vértebras de colas en animales así como en deleciones homocigóticas para este gen. Existe la teoría de que HOXB13 tal vez funcione como un represor de la proliferación de células neurales, pudiendo ser considerado como un activador de apoptosis en el Sistema Nervioso Central e igualmente, un inhibidor del crecimiento de las vértebras caudales (Economides & Capecchi, 2003; Cazal, 2004).

Por otra parte, en animales adultos, la expresión de *hoxb13* se restringe a la prostata, colon distal y recto (Sreenath *et al.*, 1999; MacMullin *et al.*, 2009). La acumulación del RNAm de HOXB13 no se ve disminuido por castración, indicando que los androgenos testiculares no son requeridos para mantener los niveles normales de expresión de dicho gen (Sreenath *et al.*, 1999; MacMullin *et al.*, 2009).

5.7.2 Expresión alterada del gen HOXB13 en cáncer mamario

Interesantemente en nuestro laboratorio Webb en el 2007 detectó la expresión del gen HOXB13 en muestras pertenecientes a los estadios I y II del desarrollo del cáncer mamario, con una fuerte correlación con la presencia de malignidad. Los resultados obtenidos en este



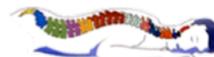


trabajo demostraron que el transcrito de HOXB13 muestra claramente su expresión selectiva en 27 de 35 muestras neoplásicas analizadas, con una alta incidencia y no se detectó su expresión en siete muestras analizadas de tejido no maligno.

La expresión del gen HOXB13 se encontró en la mayoría de las muestras de tejido maligno analizadas con una fuerte correlación con la presencia de malignidad, lo que lo postulo como un probable biomarcador molecular temprano. En tejido normal mamario, la expresión de HOXB13 se ha detectado como nula, con la excepción de un subgrupo de muestras normales en las que este gen se expresó en baja concentración en la unidad terminal del conducto lobular, lo que sugiere un papel en la fisiología mamaria normal (Yamamoto *et al.*, 2003, Svingen & Tonissen, 2003; Cantile *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004; Makiyama *et al.*, 2005). De manera similar, las líneas celulares de epitelio mamario inmortalizado SVCT y MCF-10F no expresaron el mensajero de HOXB13 (Russo *et al.*, 2001; Svingen & Tonissen, 2003; Ma *et al.*, 2004). Por el contrario, en cáncer de mama se ha encontrado la expresión de HOXB13, en once de catorce muestras de carcinoma mamario (Cantile *et al.*, 2003). Asimismo, el transcrito de HOXB13 fue detectado en la línea de cáncer de mama ductal RE positivo MCF-7, y no en el adenocarcinoma altamente invasivo y RE negativo MDA-MB-231 (Svingen & Tonissen, 2003). Por otro lado, se detectaron cantidades bajas del mensajero de HOXB13 tanto en tejido tumoral benigno como en adenocarcinomas mamarios, sin mostrar una diferencia significativa (Makiyama *et al.*, 2005). Por otra parte, Ma y cols. en el 2004 mostraron que la expresión de HOXB13 fue significativamente mas alta en carcinoma ductal *in situ* y carcinoma ductal invasivo, comparado con células epiteliales normales en un estudio realizado con RT-PCR en tiempo real y microdisección con captura de láser. Además, demostraron que la expresión de HOXB13 se limita a las células tumorales mediante hibridación *in situ*. El análisis de expresión de HOXB13 con microarreglos correlacionó la sobre-expresión de este gen con la baja expresión del receptor B de IL-7, en muestras de cáncer de mama ductal con recurrencia del cáncer al tratamiento con Tamoxifen. Además, la expresión de HOXB13 en la línea celular MCF-10A-de fenotipo normal-aumentó la movilidad, al reducir las uniones de tipo epitelial, y la invasión *in vivo* al tratarse con factor de crecimiento epidermal (EGF). Por otra parte, se ha indicado que este gen se sobre-expresa al haber exposición a estrógenos en líneas celulares de cáncer de endometrio, respondiendo de manera dependiente a tiempo y dosis (Zaho *et al.*, 2005).

Debido a que existe controversia con respecto al análisis de la expresión del gen HOXB13 en cáncer mamario y la cuantificación de dicho gen no se ha realizado en la población mujeres de población mexicana en esta tesis se cuantificaron los niveles de expresión del RNAm del gen HOXB13 en muestras de tejido mamario normal y en





carcinomas para determinar su relación con la presencia de patología maligna en tejido mamario.





6. ESTRATEGIA GENERAL





7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Amplificación del gen *HOXB13* mediante PCR Punto Final en las líneas celulares

7.1.1 Obtención de las líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron para lograr la estandarización de la amplificación del gen *HOXB13* fueron la línea celular MCF-7 proveniente de un adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo y la línea celular SiHa obtenida de carcinoma de cérvix de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16. Es importante mencionar que la línea celular MCF-7 fue amplificada generosamente por la M.C. Ana Dulce Hernández Herrera y el M.C Santiago Saavedra Alonso, ambos pertenecientes a la Unidad de Biología Molecular del Cáncer y Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunobiología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas a cargo del Dr. Pablo Zapata Benavides y la Dra. Laura Trejo Ávila respectivamente. Por otra parte, la línea celular SiHa fue propagada en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología por la M.C. Jannet Edith Salinas Hernández. Para llevar a cabo la colecta de la pastilla celular, las células se colocaron en tubos para centrifuga de 50 mL, posteriormente se centrifugaron a 2,000 rpm por un tiempo de 4 min., se vertió medio de cultivo y se añadió 10 mL de Buffer PBS 1X, se agitó suavemente, y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 min. Se repitió este paso de lavado con el buffer PBS, se retiró el sobrenadante, y la pastilla celular se congeló a -70°C (modificado de Sambrook de Russell, 2001).

7.1.2 Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares

El proceso de extracción de los RNA's totales fue realizado siguiendo el método de "aislamiento de RNA con Trizol" descrito por Simm y cols. en 1993. Se utilizó material libre de RNAsas (enzimas que degradan el RNA) tales como tubos para microcentrifuga certificados, agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich Química S.A de C.V, Toluca, México). Todas las soluciones utilizadas fueron disueltas en agua DEPC, se utilizaron recipientes de vidrio, morteros, material quirúrgico, micropipetas reservadas para uso exclusivo del manejo de RNA, todo horneado durante 3 horas a 300°C , además de que





se utilizaron guantes libres de talco y tapabocas para evitar la contaminación de las muestras. Las cámaras de electroforesis fueron tratadas previamente con RNAase Zap (Invitrogen, Carlsbad California, USA) y se limpió el área de trabajo con RNAase Zap y agua DEPC.

Homogenización

1. Mediante pipeteo se homogenizaron los cultivos celulares con Trizol (1 mL de Trizol/5 a 10×10^6 células; Invitrogen Carlsbad California, USA) en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL.

Separación de Fases

2. Para lograr la separación de fases, se incubó la solución homogenizada durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
3. Se añadieron a la solución 0.2 mL de cloroformo para cada mililitro de Trizol utilizado para la homogenización. Se mezcló en vortex vigorosamente durante 15 seg.
4. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min.
5. Una vez terminada la centrifugación se retiró el tubo gentilmente observando las 2 fases: la fase orgánica de color rojo (inferior) que es fenol-cloroformo, una interfase y la fase acuosa incolora (superior) donde se encuentran los RNA's totales.

Precipitación del RNA

6. Para la precipitación de los RNA's se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de Trizol utilizado en la homogenización inicial.

Lavado del RNA

7. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min a 4°C y se procedió al lavado de la pastilla de los RNA's, donde se removió el sobrenadante y se lavo (mezclando en vortex 2 seg) con 1 mL de etanol 75 % por cada mililitro de Trizol empleado en la homogenización inicial.

Solubilización del RNA

8. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a 4°C. Una vez obtenida la pastilla de los RNA's, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de los RNA's a temperatura ambiente de 15 a 20 min, sin permitir que se seque totalmente.





9. Se resuspendió la pastilla en 15 μL de agua DEPC.

Visualización del RNA

10. La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa al 0.8% colocados en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en buffer SB 1X. Las muestras de los RNA's fueron mezclados con 2 μL de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 min, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 10 min. La fotodocumentación de los geles con los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. Se determinó la calidad de los RNA's, así como su integridad con la presencia de las dos bandas prominentes de los RNA's ribosomales de aproximadamente 5 y 2 Kb (28S y 18S, respectivamente).

7.1.3 Cuantificación de los RNA's totales extraídos

Para cuantificar la concentración y evaluar la pureza de los RNA's extraídos se utilizaron longitudes de onda de 260nm (A_{260}) y 280nm (A_{280}) en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000™ (Thermo Scientific). La pureza de los RNA's en relación a la presencia de proteínas se obtuvo con el cociente de las absorbancias a las longitudes de 260 y 280nm (A_{260}/A_{280}).

7.1.4 Síntesis de los DNAc's a partir de los RNA's totales

La síntesis de los DNAs complementarios (DNAc's) a los RNA's se llevó a cabo mediante la técnica de "transcripción reversa" (RT) descrita por Gerard *et al.*, en 1986. Se realizaron las mismas condiciones y precauciones que en la extracción de los RNA's para evitar la contaminación por RNAsas. La mezcla de reacción se elaboró como se muestra en la Tabla IV y se homogenizó por pipeteo. Todo el procedimiento se llevó a cabo en todo momento en hielo.





Tabla IV. Mezcla de la reacción de RT-PCR	
REACTIVO	VOLUMEN (1X)
RNA's totales 0.5µg/ µL	10µL
Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 20mM	1µL
Oligo(dT) ₂₃ 0.5 µg/ µL (Invitrogen, Carlsbad, CA)	0.5µL
Agua DEPC	0.5 µL
Volumen Final	12µL

1. La mezcla de reacción se centrifugó gentilmente por unos segundos para llevar todo el líquido hasta el fondo y se incubó a 65°C por 5 min. Después se colocó en hielo inmediatamente.
2. A continuación, se añadieron los siguientes componentes de RT como se muestra en la Tabla V.

Tabla V. Componentes para la reacción de RT-PCR	
REACTIVO	VOLUMEN (1X)
Buffer de reacción 5X	4µL
DTT 0.1 M	2µL
Agua DEPC	1µL
Volumen Final	7µL

3. Se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó gentilmente por unos segundos para luego incubar la reacción por 2 min a 37°C.
4. Se añadió 1µL de la enzima transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (M-MLV, 200U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y se mezcló por pipeteo.
5. La reacción se llevó al termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf) donde se incubó a 37°C por 50 min y se concluyó con la inactivación de la reacción incubándola a 70°C por 15 min.
6. Los DNAC's se almacenaron a -20°C.





7.1.5 Amplificación del gen *HOXB13* en los DNAc's de las líneas celulares

Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la amplificación de los genes β -*actina* (producto de 276pb) y *HOXB13* (producto de 300pb) fueron los previamente descritos por la Med. Cir. Ixchelt Cuaranta Monroy donde utilizó las secuencias nucleótidas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el programa primer3 (Rozen & Skalesky, 2000), disponible en línea (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

La amplificación de los genes β -*actina* y *HOXB13* en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares se llevó a cabo mediante la metodología modificada de Sambrook & Russell (2001). Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ L en un tubo de microcentrifuga de 0.6 mL al que se le añadió 1 μ L de una dilución 1:10 de DNAc, además de 0.25 μ L de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 0.2mM, 30 ng de cada oligonucleótido, buffer 10X (con una concentración de 20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, MgCl₂ 2.5mM y 2.5 U de Taq polimerasa 5U/ μ L (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). La reacción de PCR se llevó a cabo en el Termociclador Mastercycler gradient, Eppendorf. En la Tabla VI se especifican las condiciones para la amplificación de *HOXB13*, los pasos de la reacción de PCR Punto Final, así como la temperatura, el tiempo y los ciclos en cada uno de ellos.

Tabla VI. Etapas de la reacción de PCR Punto Final			
Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94	5 min
Desnaturalización	35	94	1 min
Alineamiento		62	45 seg
Extensión		72	1 min
Extensión final	1	72	10 min

7.1.6 Visualización de los productos amplificados en geles de agarosa

La electroforesis se realizó en geles de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) al 1.2%. Para esto, se pesaron 120 g de agarosa y se añadieron a 88 mL de Buffer SB 1X (0.01M de NaOH, 0.04M H₃BO₄), para después disolverla calentando la solución uno o dos minutos en el horno de microondas. La agarosa derretida es colocada en un molde y una vez solidificada se coloca dentro de una cámara de electroforesis horizontal llena de buffer





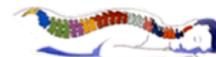
SB 1X. A continuación, se mezclaron 10µL de los productos amplificados en 2 µL de buffer de carga 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y se colocaron en los pozos del gel. En los pozos de los gel realizados se incluyó una carga de 3 µL de marcador pBS *MspI* o de marcador *λPst* los cuales fueron realizados en nuestro laboratorio como referencia. Posteriormente, se aplicó voltaje de 120 V por 40 min. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de Bromuro de Etidio a una concentración de 5µg/mL durante 10-15 min. La fotodocumentación de los geles para visualizar los productos amplificados se realizó utilizando un transiluminador de luz UV (UVP Upland, CA, EEUU) y se fotografió con una cámara Olympus Camedia C-400 equipada con un filtro de luz UV. Las imágenes fueron procesadas utilizando los programas Photostudio 5.5 (Windows) y en los casos en que la banda de amplificación fue muy tenue, se confirmó su presencia mediante el ajuste de los niveles de color en la fotografía del gel, utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0.1.

7.2 Amplificación de HOXB13 en los tejidos mamarios

7.2.1 Colecta de las muestras de tejido mamario

Las muestras de tejido mamario se obtuvieron del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Regional de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social a cargo de la Dra. Josefina Salinas del Laboratorio Forense del Hospital General de Zacatecas por el Dr. José Isaías Badillo y del Hospital General de Zona No. 6 del Instituto Mexicano del Seguro Social en colaboración con el Dr. Juan Araiza Chávez. La Dra. Salinas fue la encargada de revisar la anatomía patológica de 23 muestras de biopsias transoperatorias de adenocarcinoma mamario y dos muestras de fibroadenoma mamario, mientras que el Dr. Badillo colectó cinco necropsias de tejido mamario normal y siete muestras de cáncer de mama. Por otra parte, el Dr. Juan Araiza Chávez colectó 26 tejidos de carcinomas mamarios y 23 tejidos mamarios normales. Las muestras colectadas por parte de la Dra. Salinas y del Dr. Badillo fueron puestas en congelación para su posterior almacenamiento. Posteriormente, la Q.B.P. Martha Sofía Aguirre González, en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología, realizó los cortes y la preservación de los adenocarcinomas mamarios donados por la Dra. Salinas en Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) para su posterior procesamiento. Las muestras donadas por el Dr. José Isaías Badillo y por el Dr. Juan Araiza Chávez se colectaron en la





solución RNeasy[®] (Ambion, Austin, TX, EEUU) para ser almacenadas a 4°C por un tiempo variable (de 2 a 14 días) y finalmente se almacenaron a -20°C. Los resultados de la expresión de los marcadores moleculares de algunas muestras, fueron amablemente proporcionados por el Dr. Juan Araiza Chávez y por el Dr. Ángel Zavala Pompa del Hospital de Especialidades del IMSS No. 25.

7.2.3 Síntesis de los DNAc's a partir de los RNA's totales del tejido mamario

La metodología utilizada para la extracción de los RNA's totales de los tejidos mamarios fue similar a la realizada para la obtención de los RNA's totales de las líneas celulares. Las muestras almacenadas a -20°C se descongelaron, y se tomaron del tubo contenedor con pinzas (previamente horneadas por 3 h a 300°C), se disectó una cantidad variable de tejido (20-70 mg), se pesó, se continuó con la metodología descrita en los puntos 7.1.2 y 7.1.3. La reacción de transcripción reversa se realizó mediante el mismo método que se expuso en la sección 7.1.4.

7.2.4 Amplificación del gen HOXB13 en tejido mamario

La amplificación del gen HOXB13 en los DNAc's del tejido mamario se llevó a cabo como se describe en el punto 2.1.6. En cada reacción se incluyó un ensayo sin DNAc como testigo negativo y otro ensayo con el DNAc's de las líneas celulares como testigo positivo de la reacción de PCR.

7.3 Amplificación mediante PCR Tiempo Real de HOXB13

El PCR Tiempo Real se ha convertido en un procedimiento bien establecido para la cuantificación de la expresión génica. Los métodos tradicionales como el Northern blot, en muchos casos son inadecuados, debido a su baja sensibilidad y la necesidad de altas concentraciones del templado. La ventaja del PCR Tiempo Real es que permite una cuantificación con un rendimiento altamente reproducible, un amplio rango dinámico y una alta sensibilidad (Foster *et al.*, 2003). En la Figura 8 se muestra que los sistemas de





cuantificación por PCR Tiempo Real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de una reacción y no por medir la cantidad de un producto de PCR generado después un número determinado de ciclos, como ocurre en el PCR Punto Final. Se pueden observar las fases de amplificación de la reacción demostrando como la amplificación es exponencial, pero el aumento exponencial es limitado y eventualmente alcanza su máximo en una meseta, cuanto mayor sea el número de copias inicial del producto amplificado se detectará un incremento en la fluorescencia, como consecuencia del acumulo de productos de PCR. De esta forma es posible realizar la cuantificación del DNA o RNA de una forma más exacta y reproducible (Heid *et al.*, 1996).

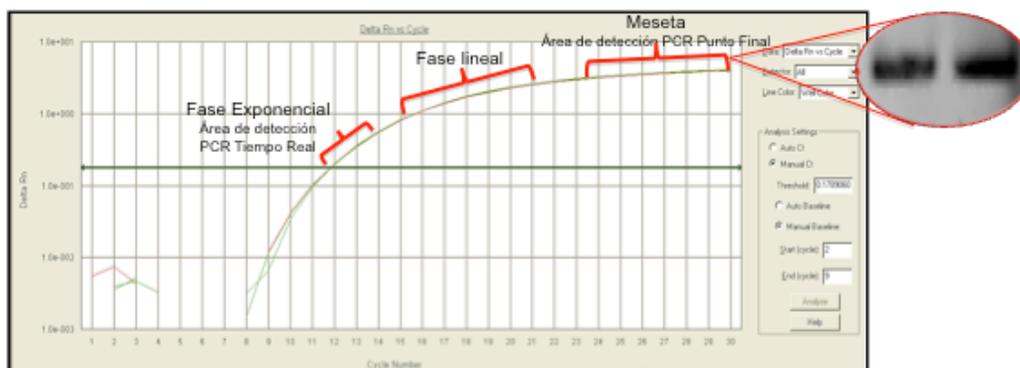


Figura 8. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR Tiempo Real. Se cuantifica la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción en contraste con la reacción de PCR Punto Final que sólo podemos estimar la cantidad de un producto de PCR generado después de un número determinado de ciclos.

En PCR Tiempo Real varios métodos han sido empleados para la detección del producto amplificado (Ponchel *et al.*, 2003). Los ensayos que se realizan mediante esta metodología se dividen en dos grandes grupos: sistemas no específicos y sistemas específicos. Los primeros detectan la presencia o ausencia de productos amplificados, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados (por ejemplo: SYBR® Green), es decir, que se pueden producir falsos positivos en el caso de la amplificación de productos de PCR inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos (Wittwer *et al.*, 1997). Por otro lado, los sistemas específicos emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (Taqman®, “molecular beacons” y “scorpions”) que hibridan específicamente en la secuencia blanco (Livak *et al.*, 1995). Uno de estos sistemas de sondas de hibridación (TaqMan®), fueron descritos por primera vez en 1991 (Holland *et al.*, 1991) y su



característica principal esta basada en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa la cual degrada una sonda marcada cuando ésta se hibrida con su secuencia complementaria (Pfaffl, 2004). La Figura 9A muestra la sonda TaqMan® que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR (Lee *et al.*, 1993). El fluoróforo adherido al extremo 5' de la sonda se le denomina reportero y el del extremo 3' recibe el nombre de inhibidor o quencher.

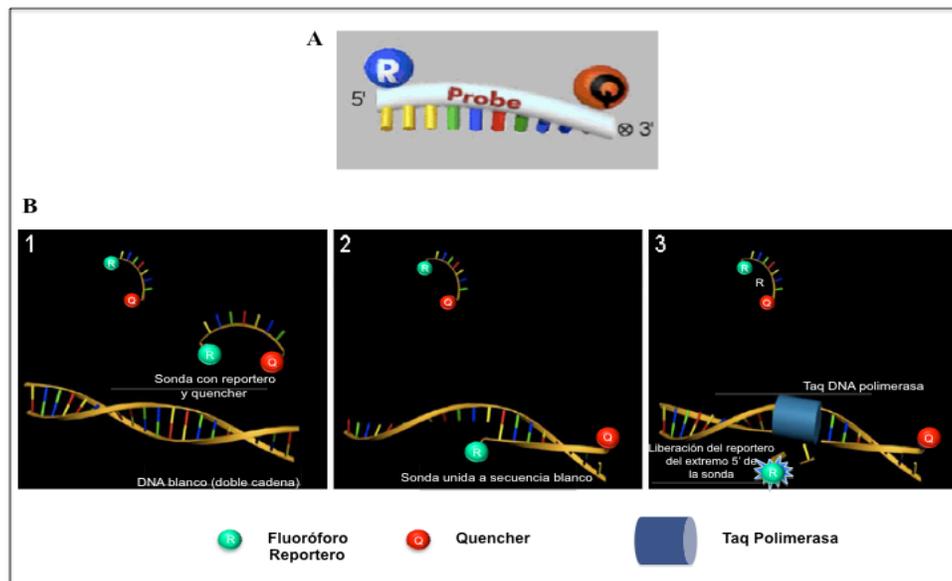
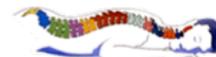


Figura 9. Uso de las sondas TaqMan en la amplificación mediante PCR Tiempo Real. A. La sonda TaqMan® es un oligonucleótido capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. La sonda contiene dos fluorocromos que dependen de la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa para separar por hidrólisis el fluorocromo reportero (R) que se encuentra situado en el extremo 5' del quencher (Q), localizado en el extremo 3'. B. Durante la amplificación, la sonda se une a su secuencia blanco, y cuando se lleva a cabo la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq DNA polimerasa, provoca la liberación del reportero del extremo 5' de la sonda, que al separarse del inhibidor emite fluorescencia. La fluorescencia de fluorocromo reportero se incrementa por su acumulación progresiva y exponencial.

En la Figura 9B se observa como primeramente el fluoróforo reportero excitado pasa su energía, vía FRET (Transferencia de energía de resonancia Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) al quencher el cual fluórese, pero esta fluorescencia no interfiere debido a que se detecta a diferente longitud de onda que la del reportero. Durante la amplificación la enzima Taq polimerasa desplaza el extremo 5' de la sonda y la degrada, este proceso libera el fluoróforo reportero y el quencher en la solución, separándolos





especialmente, esto produce un incremento irreversible en la fluorescencia del reportero y un descenso en la fluorescencia del quencher.

La fluorescencia emitida por el fluoróforo reportero es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado producido, esto hace posible la cuantificación del templado. Por tanto, cuanto mayor sea el número de copias inicial del producto amplificado se detectará un incremento en la fluorescencia, como consecuencia del acumulo de productos de PCR. De esta forma es posible realizar la cuantificación del DNA o RNA de una forma más exacta y reproducible (Heid *et al.*, 1996).

Los fluorocromos comúnmente utilizados para PCR Tiempo Real son: 6-FAMTM (6-carboxy-fluorescein), VICTM (2-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), TETTM (6-carboxy-tetrachloro-fluorescein), JOETM (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro, 6-carboxy-fluorescein) y HEXTM (hexachloro-6-carboxy-fluorescein). En el extremo 3' se utiliza TAMRATM (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) como inhibidor. Como referencia interna de las reacciones se emplea ROXTM (6-carboxy-X-rhodamine) que sirve para normalizar las reacciones, evitando fluctuaciones en la fluorescencia de las reacciones réplicas por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras. La señal generada por la referencia interna no depende de la cantidad de producto de PCR generado. Además las sondas Taqman®MGB presentan dos características innovadoras:

- a) incorporan una molécula llamada MGB (del acrónimo del inglés, minor groove binder) que se une al surco menor del DNA, lo cual incrementa la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda (Afonina *et al.*, 1997; Kutuyavin *et al.*, 1997).
- b) emplean un inhibidor no fluorescente.

MGB es una molécula pequeña, con forma de media luna, que inserta en el surco menor del DNA de doble cadena. En las sondas Taqman®-MGB, el grupo MGB va unido al extremo 3', junto al inhibidor. Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de DNA generada entre la sonda y la secuencia blanco. Esta característica ha permitido el diseño de sondas de menor tamaño, con una longitud comprendida entre 13 y 20 pb, la mitad que una sonda estándar. Por otra parte, las sondas Taqman® MGB usan un inhibidor no fluorescente, también conocido como inhibidor oscuro. Este inhibidor no fluorescente es una molécula que actúa como aceptor de transferencia energética de un inhibidor, pero que no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que emite una señal con menor fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los





datos. El inhibidor no fluorescente proporciona buenos resultados cuando se emplea como cualquiera de los fluorocromos reporteros mas comunes (FAMTM, VICTM, TETTM). Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR cuantitativo en Tiempo Real, se deben a su mayor especificidad de hibridación y a su pequeño tamaño. Esto permite una mayor discriminación, que facilita el diseño de ensayos y reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del ensayo. La amplificación del gen HOXB13 en los DNAc's obtenidos de los tejidos de mama se llevó a cabo mediante la metodología de PCR Tiempo Real y se utilizó el kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem California, E. E. U.U.) Cada reacción de PCR Tiempo Real se preparó adicionando los DNAc's a partir de 250 ng de RNA total de las muestras. En la Tabla VII se especifican las condiciones de la reacción de PCR Tiempo Real. El procedimiento se llevó a cabo en todo momento en una campana fija en tubos de microcentrifuga de 0.6 mL.

Tabla VII. Componentes para la reacción de PCR Tiempo Real	
REACTIVO	VOLUMEN (1X)
TaqMan® Universal PCR Gene Expression Master Mix (2X)	5 µL
TaqMan Gene Expression Assay (20X) (mezcla de oligonucleótidos y sonda TaqMan)	0.5 µL
DNAc	4 µL
H ₂ O mQ estéril	X
Volumen Final	10 µL

2. La mezcla de reacción se procedió a mezclar gentilmente para posteriormente centrifugar los tubos brevemente para asegurar de que no quedara reactivos en las paredes del tubo.
3. Para la amplificación se colocaron los tubos en el termociclador DNA Engine cyler con la unidad de detección de fluorescencia para tiempo real Chromo4 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.), bajo las condiciones especificadas en la Tabla VIII. La reacción de PCR Punto Final consta habitualmente de tres etapas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas de DNA y extensión del producto amplificado mediante la incorporación de los nucleótidos presentes en la solución, en contraste con la técnica de PCR Tiempo Real que emplea dos etapas, debido al pequeño tamaño de





los fragmentos generados, no es necesario añadir una tercera etapa a 72°C para extender la cadena de amplificación de DNA, ya que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los cebadores a 60°C y de desnaturalización a 95°C es suficiente para copiar la secuencia blanco.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1 ciclo	50	2 min
1 ciclo	95	10 min
40 ciclos	95	15 seg
	60	1 min

La Figura 10 muestra una representación de los datos obtenidos en el detector de fluorescencia Cromo4 y que fueron graficados usando el programa Opticon Monitor™ 3.1 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U), el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. Durante los ciclos tempranos de la PCR, la fluorescencia de fondo es usada para determinar la línea basal donde la concentración de los reactivos no es limitante por lo que los valores de C_T obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar el producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción. El parámetro de C_T (ciclo umbral o threshold cycle) se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral.



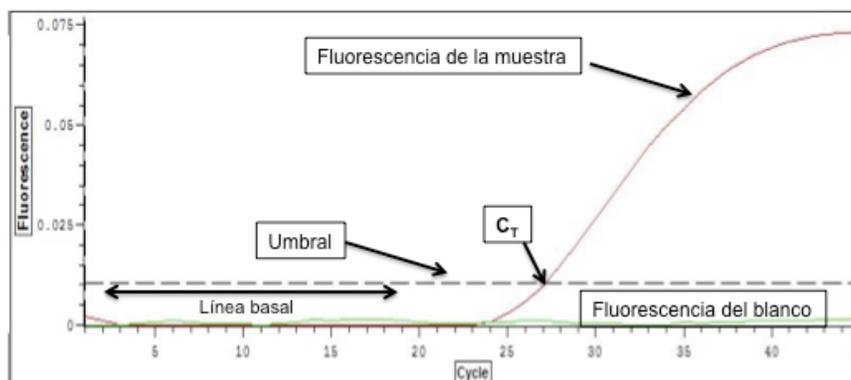
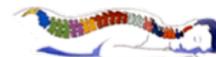


Figura 10. Representación de la amplificación mediante PCR Tiempo Real en el programa Opticon Monitor®. La línea basal del gráfico de amplificación se refiere a los ciclos iniciales de la PCR en los que hay muy pocos cambios en la señal de fluorescencia. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar el producto de PCR acumulado. El parámetro C_T (ciclo umbral o threshold cycle) es definido como la fracción de número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral.

El valor del C_T se obtiene cuando la reacción está en la fase exponencial y ningún componente de la reacción está limitado, por lo que los valores de C_T obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales. Por el contrario, la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en los componentes de la reacción. El programa Opticon MonitorTM analiza los datos calculando la contribución de cada componente fluorescente al experimento. En los ciclos iniciales de la PCR, apenas hay cambios en la señal de fluorescencia (ΔR_n). Esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. La línea umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción (que es la línea en la transformación logarítmica del gráfico), y en donde la eficiencia de la reacción de PCR debe ser de 90 a 110 %.

7.3.1 Cuantificación Relativa ($\Delta\Delta C_T$) del nivel de expresión del gen HOXB13

La cuantificación por PCR Tiempo Real se puede realizar por dos métodos: la cuantificación absoluta o la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta requiere la construcción de curvas estándar basadas en concentraciones conocidas del templado, mientras que en la cuantificación relativa se determinan cambios en el nivel de expresión en





comparación con una muestra de referencia conocida como calibrador, este método tiene la ventaja de que no se necesita la construcción de una curva estándar. Para la mayoría de las aplicaciones en investigación el método de cuantificación relativa es más práctico porque compara directamente la muestra experimental con la muestra control (Foster *et al.*, 2003). En este tipo de cuantificación se requiere la normalización de la expresión de los genes a cuantificar mediante la cuantificación de la expresión de un gen constitutivo, el cual es utilizado para compensar las variaciones del nivel de expresión de los genes causadas por diferentes concentraciones de templado en la reacción de amplificación.

7.3.2 Análisis de curvas de regresión

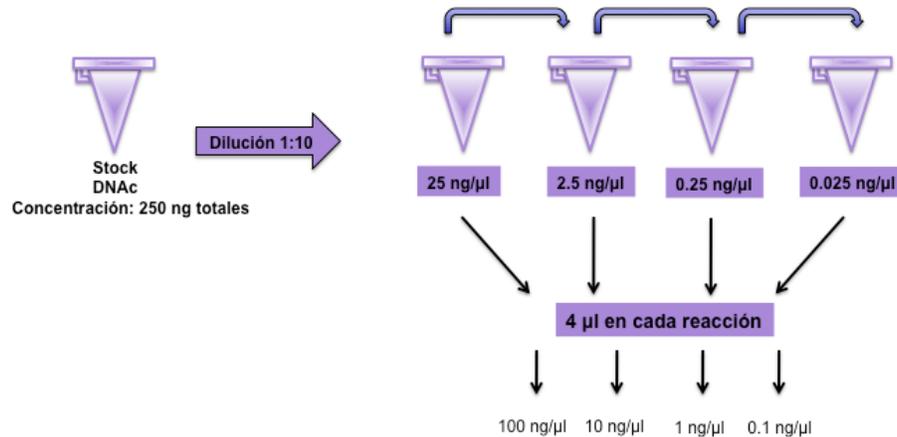
Se realizaron curvas de rango dinámico para determinar la concentración óptima de los DNAc's en la reacción de amplificación. Los DNAc's obtenidos de la línea celular SiHa (sección 7.2.3), fueron de: 250, 25, 2.5 y 0.25 ng/ μ L de RNA's totales. Las condiciones de amplificación son las mismas que las indicadas en la sección anterior, los oligonucleótidos y la sonda Taqman® utilizados fueron diseñados y sintetizados por la compañía Applied Biosystems, la sonda Taqman® tiene MGB y está marcada con los fluoróforos reporteros VIC™ y FAM™ (β -actina y HOXB13 respectivamente) y el inhibidor sin fluorescencia. Las curvas de rango dinámico para analizar el control endógeno β -actina y HOXB13 se realizaron con: 25, 2.5, 0.25 y 0.025 ng/ μ L de RNA's totales como se describe en la Tabla IX.

Tabla IX. Componentes para la reacción de PCR Tiempo Real	
REACTIVO	VOLUMEN (IX)
TaqMan® Universal PCR Gene Expression Master Mix	5 μ L
TaqMan Gene Expression Assay VIC	0.5 μ L
TaqMan Gene Expression Assay FAM	0.5 μ L
DNAc	4 μ L
Volumen Final	10 μ L





1. Las diluciones de los DNAc's se llevaron a cabo de la siguiente forma:



2. Se procedió a cerrar los tubos muy bien para mezclarlos levemente con la mano y centrifugarlos brevemente para asegurar que ningún reactivo quede en las paredes del tubo.
- 1 Después se realizó la amplificación en el termociclador DNA Engine Cycler con la unidad de detección de fluorescencia para Tiempo Real Chromo4 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.), bajo las condiciones especificadas en la Tabla VIII..

Una vez concluido el análisis de los datos en el programa Opticon Monitor™ 3.1, se obtiene la curva de regresión (Figura 11) que muestra los valores de C_T en el umbral determinado contra el logaritmo de las concentraciones de RNA. Esta gráfica produce una línea recta llamada línea de tendencia donde la pendiente refleja un valor para calcular la eficiencia de la reacción de PCR.



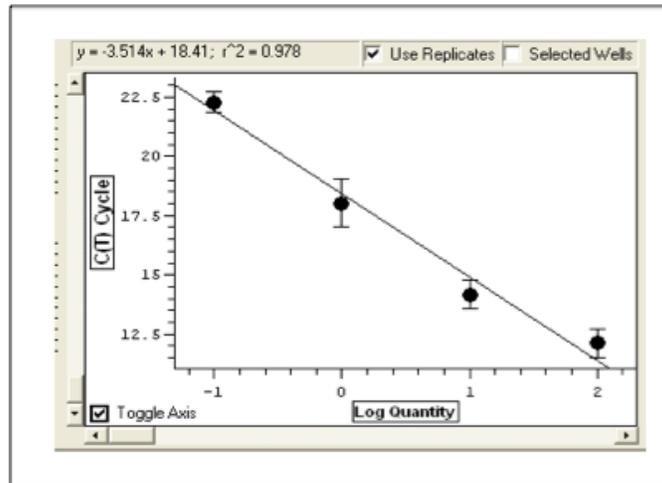


Figura 11. Curva de regresión obtenida por el programa **Opticon Monitor™ 3.1** para evaluar la eficiencia de la amplificación de β - actina y HOXB13. La eficiencia de amplificación del gen β - actina y HOXB13 fue calculada utilizando los valores correspondientes de C_T para cada gen vs el logaritmo de la concentración de RNA total en cada reacción de PCR. Se observa el valor del intercepto (y) el cual nos sugiere el número de ciclos necesarios para que el blanco ya no este presente en la reacción de PCR Tiempo Real.

La línea de tendencia producida en la curva de regresión originada por el programa **Opticon Monitor™ 3.1**, nos aporta la siguiente información:

Valor de r^2 : Es el cuadrado del coeficiente de regresión el cual nos indica como se ajustan nuestros datos en la línea. El análisis de regresión lineal de la curva estándar debe mostrar una alta correlación (un coeficiente > 0.98).

m (pendiente de la curva): El valor de m (observar en Figura 11 la ecuación, lado superior izquierdo $y=-3.514$) se utiliza para calcular la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

El valor obtenido de la eficiencia de amplificación debe encontrarse en un rango entre 80 y 110% para que el ensayo sea considerado válido para realizar la cuantificación relativa.





Intercepto (y): Nos da una idea de que tan sensible es el ensayo. Sugiere el número de ciclos necesarios para que el blanco ya no este presente en la reacción de PCR Tiempo Real.

7.3.3 Construcción de curvas de rango dinámico para la validación del método $\Delta\Delta C_T$

El método comparativo $\Delta\Delta C_T$ descrito por la compañía Applied Biosystem asume que la eficiencia de amplificación es igual y óptima, es decir del 100%, para los genes de referencia (β -actina) y blanco (HOXB13), en muchos casos no se puede obtener, además de que se requiere la optimización de la reacción, el uso de reactivos y tiempo. Por lo que Pfaffl en el año 2001 propone una fórmula alterna en donde incluye las eficiencias de amplificación para los genes de referencia y blanco, posteriormente MultiD Analyses AB® en su programa Genes Light Ver 4.3.2 sugiere normalizar los valores de C_T obtenidos con la eficiencia de las reacciones de PCR de los genes blanco y de referencia, mediante la siguiente fórmula:

$$C_{TE} = 100\% = C_{TE} \frac{\log(1+E)}{\log(2)}$$

Una vez calculada y normalizada la eficiencia de amplificación del gen HOXB13 y de el gen constitutivo β -actina, los datos de C_T fueron sustituidos en la siguiente ecuación para realizar el cálculo de ΔC_T para cada una de las concentraciones de RNA obtenidas en la sección 7.3.2:

$$\Delta C_T = C_T \text{HOXB13} - C_T \beta\text{-actina}$$

A continuación se graficó el valor de ΔC_T contra el logaritmo de la concentración de RNA, la pendiente de la recta obtenida mediante esta gráfica debe de ser menor o igual a 0.1 lo cual indica que la eficiencia de amplificación de ambas reacciones en la misma y que el ΔC_T no varía con respecto a la concentración de los DNAs. Este resultado le da validez al método de Cuantificación Relativa.



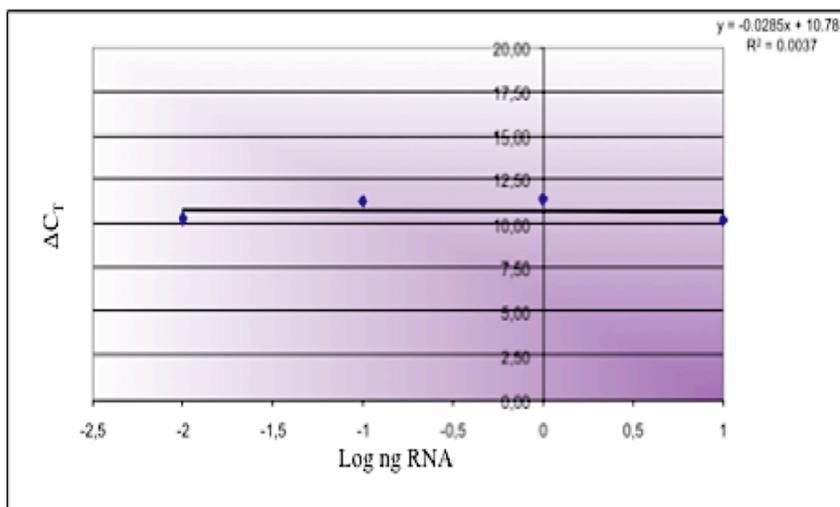


Figura 12. Curva de Rango Dinámico. Esta curva grafica el ΔC_T vs el logaritmo de la concentración de RNA total utilizado en cada reacción de PCR, la línea obtenida tiene que tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del método ΔC_T que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) sea la misma.

7.3.4 Cuantificación Relativa de la expresión del gen HOXB13 (método $\Delta\Delta C_T$)

Una vez validado el método de Cuantificación Relativa se realizó la amplificación mediante PCR Tiempo Real de los DNAc's obtenidos de las muestras de tejidos mamarios (concentraciones de 250 ng de RNA total), con la metodología ya mencionada en la sección 7.3.2, tanto del gen β -actina (gen de referencia) como del gen HOXB13 (gen blanco). Los C_T 's obtenidos de nuevo fueron normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR tanto en el gen de referencia como en el blanco (sección 7.3.3) y se obtuvieron los ΔC_T para cada muestra. Posteriormente, se realizaron los cálculos matemáticos para la obtención de la Cuantificación Relativa de HOXB13 comparando la muestra de tejido neoplásico contra el tejido normal con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra de cáncer} - \Delta C_T \text{ muestra normal}$$

Con el $\Delta\Delta C_T$ calculado solo se aplica directamente la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{\text{Expresión de HOXB13 Relativa}}{\text{a muestra normal de mama}}$$





De esta forma tenemos el resultado de cuántas veces se expresa el gen HOXB13 en las muestras de tejido mamario maligno en comparación con el tejido mamario normal.

7.4 Tipo de Estudio y Análisis Estadístico

El tipo de estudio que fue llevado a cabo es transversal, descriptivo y observacional. La expresión mediante PCR Punto Final del gen HOXB13, el tipo de tejido analizado (patología normal, benigna y maligna), y la expresión relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real fueron las variables analizadas. Los datos fueron sometidos a estadística descriptiva y exploratoria, y los datos cuantitativos se presentan en el texto y en las Figuras como las medias \pm desviación estándar.

Los datos obtenidos de la expresión de HOXB13 por PCR Punto Final fueron datos cualitativos los cuales fueron analizados mediante la prueba de ji-cuadrada (X^2). Se realizaron comparaciones de medias o de medianas de la expresión relativa del gen HOXB13 medida como $\Delta C_T = C_T \text{HOXB13} - C_T \text{B-actina}$. Se comprobaron los requisitos de normalidad para la distribución normal.

Al comparar una o dos medias de ΔC_T de poblaciones normales con muestras pequeñas (< 25 unidades para alguna de las poblaciones) se utilizó la prueba t. Si la población o poblaciones normales eran grandes se utilizó una prueba Z. Para analizar dos poblaciones no normales con al menos una muestra pequeña, se decidió utilizar la prueba de Kruskal Wallis para diferencia de medianas. Si ambas poblaciones tenían muestras grandes, se utilizó la prueba Z para medias. Cuando se analizaron más de dos poblaciones normales se utilizó un análisis de varianza para probar la igualdad de las medias, y en aquellos casos en donde la hipótesis nula fue rechazada se aplicó la prueba de contrastes HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey para probar cuáles medias fueron diferentes. En los casos en los que las poblaciones no seguían una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para diferencia de medianas. Para las variables continuas del análisis de los marcadores moleculares (Receptor de Progesterona (RP), Ki67 y p53) se utilizó una regresión lineal simple y se realizó inferencia con respecto a la pendiente. Se mantuvo el nivel global de α de todas las comparaciones en 0.005. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete Minitab versión 15 (2007 Minitab Inc, State College, Pensilvania, USA).





8. RESULTADOS

8.1 *Expresión del gen HOXB13 en líneas celulares*

8.1.1 *Amplificación del gen HOXB13 en las líneas celulares MCF-7 y SiHa*

Para estandarizar la amplificación del gen HOXB13 mediante PCR Punto Final en los tejidos mamarios se eligieron las líneas celulares MCF-7 y SiHa en las cuales se expresa el gen HOXB13 de acuerdo a lo descrito previamente por Svingen & Tonissen (2003).

8.1.1.1 *Obtención de los RNA's totales a partir de las líneas celulares*

La obtención de los RNA's totales de los paquetes celulares de las líneas MCF-7 y SiHa se llevó a cabo mediante la técnica de Trizol descrita previamente en Materiales y Métodos. La Figura 13 muestra la extracción de los RNA's totales extraídos de las dos líneas celulares, con una buena calidad electroforética, se puede observar de manera definida las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S las cuales identifican la integridad de los RNA's obtenidos. La concentración de los RNA's obtenidos fue de 10 µg totales para MCF-7 y de 32 µg totales para SiHa. La relación de absorbancia a las longitudes de onda 260/280 correspondió a 1.8 y 1.9 respectivamente en las dos muestras lo que indica una buena cantidad y pureza de los RNA's extraídos.



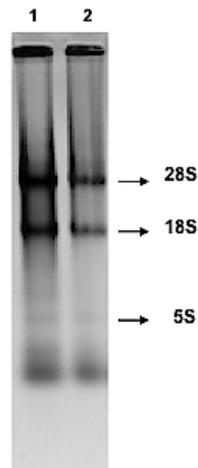


Figura 13. Extracción de los RNA's totales en la líneas celulares. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Los RNA's totales obtenidos de la línea celular SiHa se observa en el carril 1 y los extraídos de MCF-7 en el carril 2. Se muestran de manera definida las bandas 28S y 18S de los RNA's ribosomales que indican la integridad del RNA en las líneas celulares. Cada carril contiene aproximadamente 1 µg de RNA total.

8.1.1.2 Amplificación del gen *HOXB13* mediante PCR Punto Final

Para analizar la expresión del gen *HOXB13* se utilizaron los RNA's totales obtenidos de las células SiHa y MCF-7 en la síntesis a DNAc's mediante transcripción reversa y posteriormente se realizó la amplificación de *HOXB13* mediante PCR Punto Final como se especifica en materiales y métodos. Los oligonucleótidos fueron diseñados con una estabilidad del 100% para que reconocieran específicamente las secuencias nucleotídicas blanco las cuales fueron obtenidas en el Gene Bank (Cuaranta-Monroy, 2008). Se descartó la presencia de dímeros de oligonucleótidos y de presencia de productos amplificados inespecíficos mediante amplificación virtual. La presencia de productos amplificados inespecíficos se minimizó utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), en los que los oligonucleótidos que reconocieron secuencias de otros genes fueron eliminados.

8.1.1.2.1 β -actina

La amplificación del gen constitutivo β -actina se realizó para corroborar la calidad de los RNA's totales obtenidos, así como para analizar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción. Los pesos moleculares de los productos amplificados del gen β -actina





fueron obtenidos mediante ampliificaciones virtuales usando el programa AmplifX 1.37 (Fig. 14A). De la misma manera, se puede destacar que los oligonucleótidos permiten diferenciar la presencia de DNA genómico de β -actina con una banda de 717pb (Figura 14B). El producto amplificado obtenido de 276pb corresponde al tamaño esperado para β -actina en todas las reacciones de transcripción reversa como se muestra en la Figura 14C.

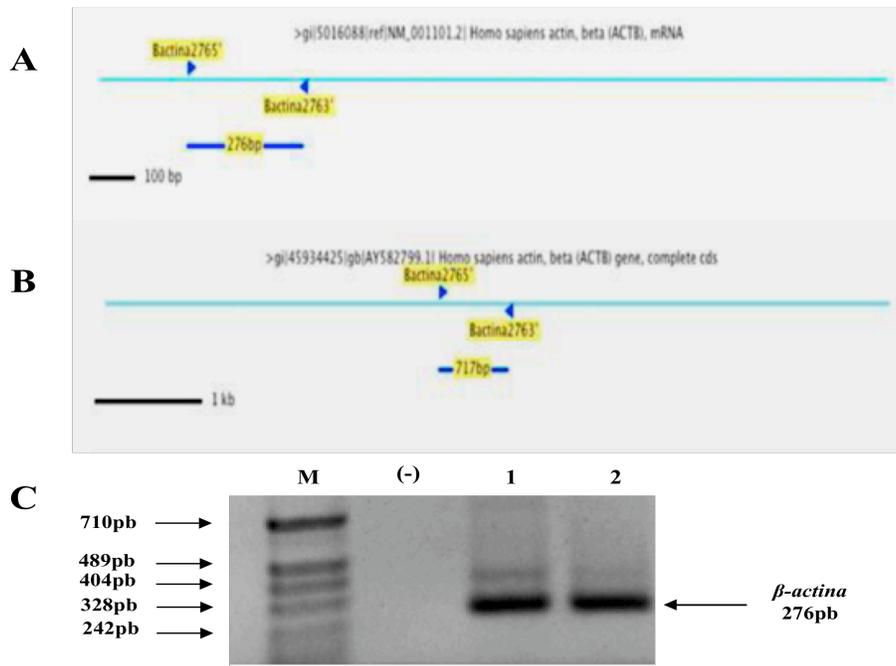


Figura 14. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR. En **A** y **B** se muestran los diagramas de las ampliificaciones virtuales de PCR con los oligonucleótidos β -actina 2765' y β -actina 2763' (señalados con flechas azules) utilizando el programa de AmplifX 1.37. Las secuencias de DNA (marcadas con líneas de color celeste) fueron obtenidas del Gene Bank para los DNAc's en A y DNA genómico en B. Los oligonucleótidos utilizados reconocen a la secuencia blanco específicamente con una estabilidad del 100 % amplificando un producto de 276pb en el caso de la secuencia codificante por los DNAc's obtenidos de las células y de 710pb en la secuencia genómica. En **C** se muestra la reacción de PCR a partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa (carril 1) y MCF-7 (carril 2) en un gel de agarosa 1.2 % para lograr visualizar una banda de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc blanco y el carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *MspI*.

8.1.1.2.2 HOXB13

Para la amplificación del gen HOXB13 se utilizaron los oligonucleótidos HOXB135' y HOXB133' (Cuaranta-Monrroy, 2008) los cuales reconocen específicamente la secuencia blanco de HOXB13 con una estabilidad del 100% amplificando una banda de 300pb sobre





la secuencia codificante y de 1249pb en el DNA genómico, como se muestra en las ampliificaciones virtuales de la Figuras 15A y B respectivamente. La ampliificación en la Figura 15C muestra la banda de 300pb obtenida mediante PCR a partir de los DNAc's de la línea celular MCF-7 y SiHa con una temperatura de alineamiento de 62°C y con 2.5mM de MgCl₂.

La ampliificación del gen β -actina en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares y del tejido mostró una buena intensidad en la banda que indica la calidad óptima de las extracciones de RNA. Debido a la alta intensidad de las bandas de ampliificación obtenidas, se realizaron diluciones 1/10 de estos DNAc's para la obtención de la banda visible de β -actina.

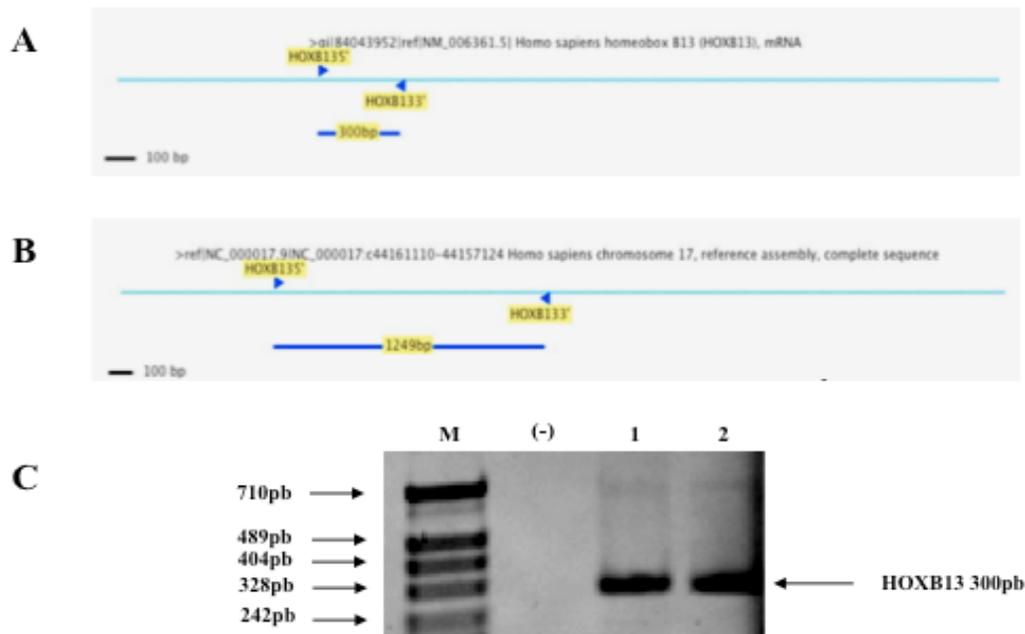


Figura 15. Amplificación de HOXB13 en las líneas celulares SiHa y MCF-7 mediante PCR Punto Final.

En A y B se muestran los diagramas de las ampliificaciones virtuales con los oligonucleótidos HOXB135' y HOXB133' utilizando el programa AmplifX 1.37. En A se encuentra la ampliificación virtual con el DNAc blanco y en B con el DNA genómico. Los oligonucleótidos amplifican un producto de 300pb en la muestra de DNAc y de 1249pb en el DNA genómico. En C se muestra la ampliificación de HOXB13 a partir de los DNAc's obtenidos de las líneas celulares SiHa (carril 1) y MCF-7 (carril 2). El tamaño del producto amplificado de HOXB13 fue de 300pb con una temperatura de alineamiento de 62°C y con 2.5 mM de MgCl₂. El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc blanco y el carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con a enzima de restricción *Msp I*.



Los resultados descritos anteriormente muestran la amplificación exitosa de los DNAc's de HOXB13 en las líneas celulares MCF-7 y SiHa utilizando la técnica de PCR Punto Final incluyendo el gen de β -actina en los ensayos para validar los resultados de la expresión del gen HOXB13.

8.2 Cuantificación del nivel de expresión del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en las líneas celulares

Para cuantificar la expresión de HOXB13 en las líneas celulares, se realizó la estandarización de la reacción de PCR Tiempo Real del gen HOXB13 y de β -actina con los DNAc's previamente obtenidos en la línea celular SiHa.

8.2.1 Estandarización de la expresión del gen β -actina en células SiHa

Para la estandarización de la cuantificación de la expresión de β -actina mediante PCR Tiempo Real se realizó una curva estándar que permitió determinar la eficiencia de la reacción de amplificación con los oligonucleótidos limitados específicos para β -actina y una sonda Taqman® marcada con el fluoróforo VIC (Applied Biosystems). La Figura 16A muestra la amplificación de β -actina en los DNAc's de las células SiHa mediante la acumulación de fluorescencia por los productos amplificados de una región del transcrito β -actina. En la Figura 16B se muestra la eficiencia de la reacción de PCR con las condiciones usadas demostrando el valor de la pendiente en la línea de tendencia por medio de una regresión lineal de los C_T obtenidos y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de RNA's totales a partir de los cuales se sintetizaron los DNAc's contenidos en la reacción de PCR. La pendiente obtenida fue de -3.514 y mediante la fórmula $E=10^{[-1/pendiente]}$ se obtuvo la eficiencia (E)= 1.935. Esta eficiencia fue considerada adecuada ya que la recomendada para llevar a cabo adecuadamente el análisis de los datos de expresión génica relativa puede variar en un rango del 90-110% (Nolan *et al.*, 2006).



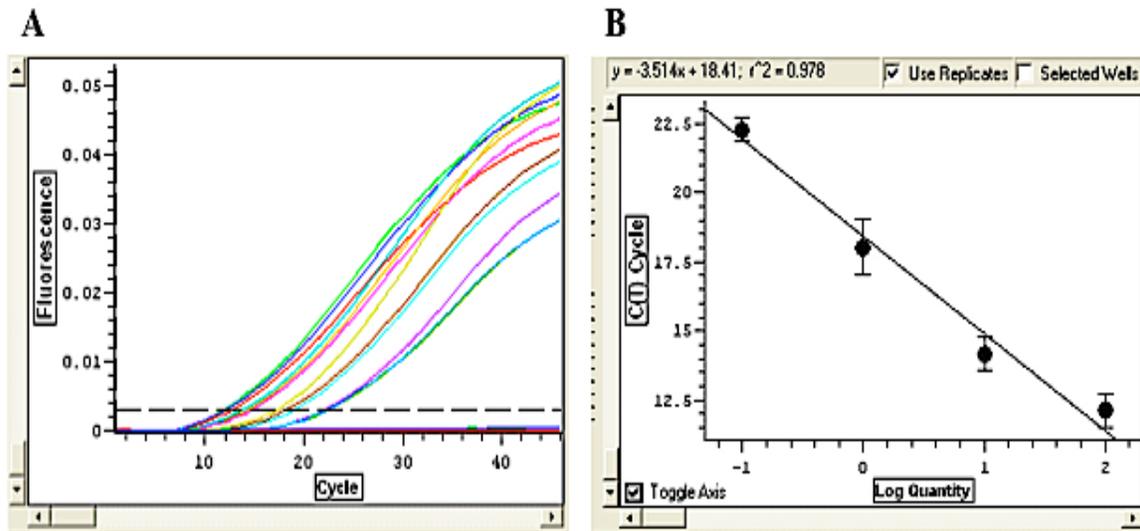


Figura 16. Curva de calibración para verificar la eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® y cuantificar la expresión del gen constitutivo β -actina en los DNAc's de las células SiHa. Se realizó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas por triplicado de los DNAc's provenientes de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para el gen β -actina utilizando el termociclador Chromo 4™ (BioRad, CA USA). **A.** Curva de amplificación del gen β -actina obtenida por el programa Opticon Monitor™ a partir de concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 ng de los RNA's totales obtenidos de la línea celular SiHa a partir del cual se sintetizaron los DNAc's. **B.** Curva de calibración donde se grafica el C_T obtenido contra el logaritmo de la concentración de RNA's en cada dilución (se muestra el promedio y la desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R^2 y el valor de la pendiente (m) se indica en la parte superior del lado izquierdo de la grafica. La Eficiencia ($E=1.93$) fue calculada a partir de la formula $E=10^{[-1/pendiente]}$ y la eficiencia en porcentaje con la formula $1-E \times 100$ dando un resultado de 93% con lo cual se encuentra dentro del rango establecido para la cuantificación.

8.2.2 Estandarización de la expresión de HOXB13 en células SiHa

La estandarización de HOXB13 se llevó a cabo con una curva estándar para determinar la eficiencia de la reacción de PCR con los oligonucleótidos limitados específicos para HOXB13 y una sonda Taqman® marcada con el fluoróforo FAM (Applied Biosystems). La Figura 17A muestra la curva de amplificación del gen HOXB13 en los DNAc's de las células SiHa obtenidas en el termociclador Cromo 4™ y graficadas por el programa Opticon Monitor™. La curva estándar se realizó con diluciones seriadas 1:10 de los DNAc's y para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR en éstas condiciones se obtuvo el valor de la pendiente en la línea de tendencia de una regresión lineal de los C_T obtenidos en cada reacción de PCR y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de





RNA total a partir de las cuales fue sintetizado el DNAc contenido en la reacción como se observa en la Figura 17B. La pendiente obtenida fue de -3.519 y mostró una eficiencia del 93% que se encuentra dentro del rango especificado para realizar la cuantificación de la expresión génica sin la necesidad de optimizar ninguno de los componentes de la reacción de PCR.

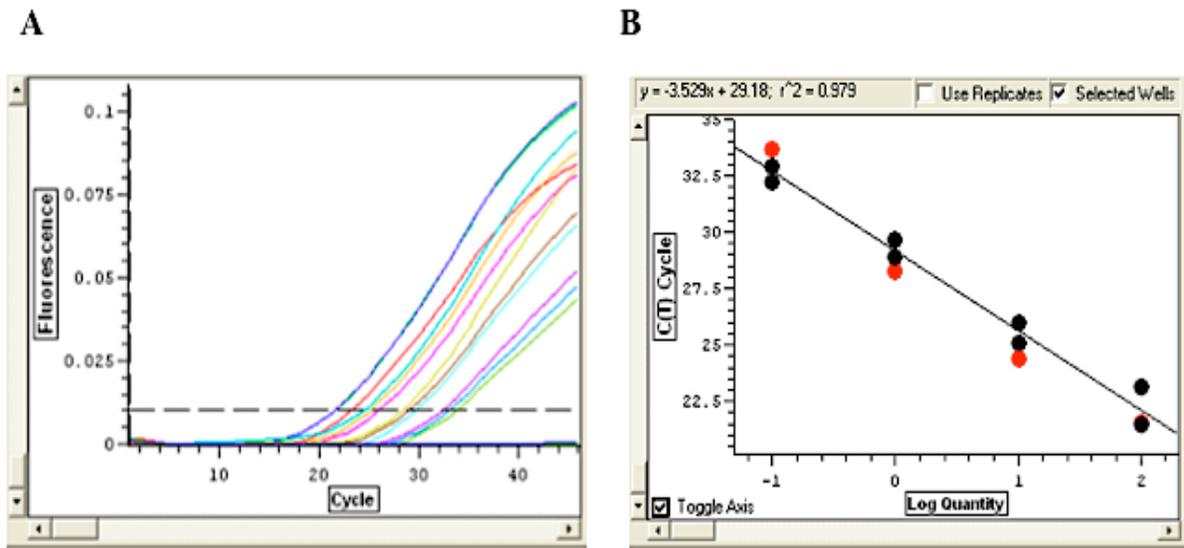


Figura 17. Curva de calibración para verificar la eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® y cuantificar la expresión para el gen HOXB13 en los DNAc's de las células SiHa. Se realizó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas por triplicado de los DNAc's provenientes de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para el gen HOXB13 utilizando el termociclador Chromo 4™ (BioRad, CA USA). **A.** Curva de amplificación del gen HOXB13 obtenida por el programa Opticon Monitor™ a partir de concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 ng de los RNA's totales obtenidos de la línea celular SiHa a partir del cual se sintetizaron los DNAc's. **B.** La grafica indica la Curva de calibración donde se grafica el C_T obtenido contra el logaritmo de la concentración de RNA's en cada dilución (se muestra el promedio y la desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R^2 y el valor de la pendiente (m) se indica en la parte superior del lado izquierdo de la grafica. La Eficiencia ($E=1.93$) fue calculada a partir de la formula $E=10^{[-1/pendiente]}$ y la eficiencia en porcentaje con la formula $1-E \times 100$ dando un resultado de 93% con lo cual se encuentra dentro del rango establecido para la cuantificación.

Para la validación del método $\Delta\Delta C_T$ en la cuantificación del gen HOXB13, los valores de los C_T obtenidos en cada una de las curvas estándar fueron corregidos de acuerdo a la formula descrita en el punto 6.3.3 (Materiales y Métodos), lo que permitió la normalización de acuerdo a la eficiencia de amplificación para cada gen. Posteriormente, se





obtuvo el ΔC_T , restando los C_T 's de la amplificación del gen β -actina a los valores de C_T obtenidos de la amplificación del gen HOXB13. El valor de ΔC_T para cada una de las diluciones utilizadas fue graficado contra el logaritmo de la concentración de los RNA's totales (ng) en de cada dilución. La Figura 18 muestra los resultados de esta gráfica donde la pendiente obtenida (-0.0285) se encuentra dentro del rango indicado para la validación de este método (menor o igual a 0.1), lo cual indica que la diferencia en la expresión entre el gen de referencia (β -actina) y el gen problema (HOXB13) no presenta variaciones significativas en las diferentes concentraciones probadas de los DNAc's.

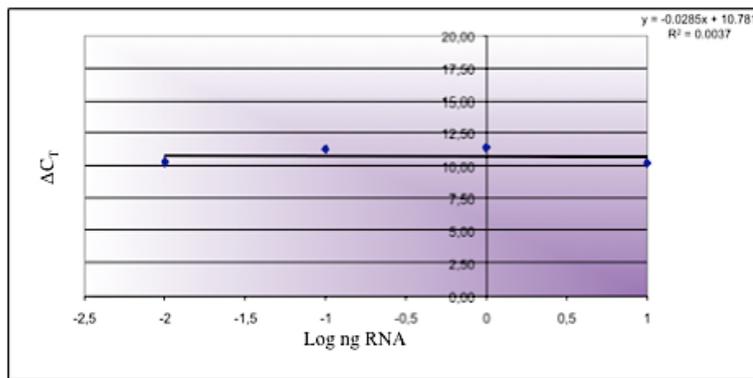


Figura 18. Curva de rango dinámico para la validación del método $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de la expresión génica del gen HOXB13. A los C_T obtenidos para la curva de calibración del gen HOXB13 se les restaron los C_T obtenidos para el gen β -actina (previamente normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR para cada gen) obteniendo de esta forma el ΔC_T para cada una de las concentraciones de los RNA's totales a partir de la cual se realizó la RT-PCR. En la imagen se muestra la gráfica con el ΔC_T contra el logaritmo de la concentración de RNA en cada dilución y se indica en la parte superior de la gráfica la ecuación de la línea de regresión y el valor de R^2 . La pendiente de la recta (-0.0285) se encuentra dentro del rango establecido (≤ 0.1) para la validación de este método de cuantificación.

8.2.3 Cuantificación relativa de la expresión del gen HOXB13 en las líneas celulares

La cuantificación relativa del gen HOXB13 se realizó en las líneas celulares MCF-7 y SiHa y se comparó contra un pool de tres tejidos mamarios normales. Los valores de C_T tanto para el gen HOXB13 como para el gen de referencia (β -actina) fueron normalizados y se aplicó la fórmula del método $\Delta\Delta C_T$ previamente validado para estas condiciones utilizando el ΔC_T de la línea celular y como valor calibrador el ΔC_T del pool de tejido mamario normal. Con el $\Delta\Delta C_T$ ya calculado solo se aplicó directamente la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.





Lo anterior permitió obtener la cuantificación de la expresión para el gen HOXB13 en las líneas celulares. Los valores en la Tabla X muestran el número de veces que se sobre-expresa HOXB13 en cada una de las líneas celulares con respecto a un pool de 3 tejidos normales.

Tabla X. Cuantificación relativa del gen HOXB13 en líneas celulares	
Línea Celular	Expresión relativa de HOXB13 con respecto a un pool de Tejidos Mamarios Normales
MCF-7	4.451 ± 0.644
SiHa	36.723 ± 0.876

El análisis de la cuantificación de la expresión de HOXB13 en las líneas celulares en escala logarítmica (Figura 19) muestra una diferencia clara en los valores obtenidos correspondientes a 4.5 veces en MCF-7 y 36.7 veces en SiHa. Estos valores de cuantificación de los transcritos de HOXB13 mediante PCR Tiempo Real evidentemente muestran la expresión positiva de HOXB13 en ambas líneas celulares, en las que la línea celular SiHa muestra mayor sobre-expresión de HOXB13 de hasta 36.7 veces comparada con la línea celular MCF-7 la cual muestra una sobre-expresión de HOXB13 hasta de 4.5 veces, por lo que se decidió tomar como control positivo a la línea celular SiHa. El análisis estadístico de estos resultados muestra que esta diferencia es significativa ($p=0.031$).



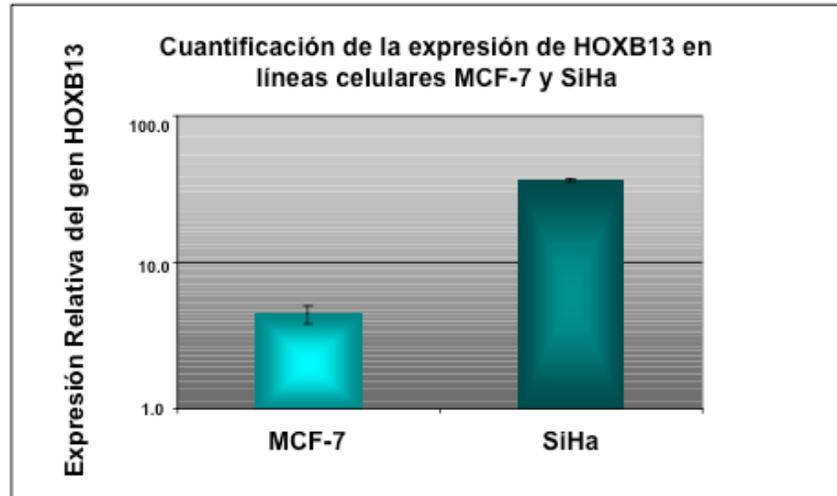


Figura 19. Cuantificación relativa de la expresión génica del gen HOXB13 en las líneas celulares SiHa y MCF-7. La cuantificación de la expresión génica de HOXB13 se realizó mediante PCR Tiempo Real. El análisis de la expresión de los genes β -actina y HOXB13 se hizo por triplicado en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares, usando el método $\Delta\Delta C_T$. La cuantificación de cada una de las líneas se comparó contra un pool de 3 tejidos mamarios normales. Las barras muestran la cuantificación de la expresión génica de HOXB13 (media y desviación estándar) que va desde 4.5 veces en escala logarítmica en la línea celular MCF-7 (turquesa) y de 36.7 veces en SiHa (verde oscuro) siendo el valor de 1 correspondiente al tejido normal.

8.3 Expresión de HOXB13 en tejidos mamarios

Una vez estandarizada la expresión del gen HOXB13 mediante PCR Punto Final y validado el método $\Delta\Delta C_T$ por PCR Tiempo Real, se realizó la extracción de los RNA's totales de las muestras de tejido mamarios humanos, para analizar la detección del gen HOXB13.

8.3.1 Obtención de los RNA's totales a partir de los tejidos mamarios

El aislamiento de los RNA's totales de los tejidos mamarios normales, con y sin patología maligna, ya sea preservados en RNAlater® o en Trizol se llevó a cabo usando el método de Trizol descrito previamente en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en la extracción de los RNA's totales muestran de manera definida las bandas 28S y 18S de los RNA ribosomales que indican la buena integridad del RNA en los tejidos preservados





en RNAlater® (Ambion), como se presenta en la Figura 20 (carriles 1 y 2); en contraste, los RNA's totales obtenidos a partir de los tejidos conservados en Trizol (Invitrogen) muestran una menor integridad como se muestra en el carril 3.

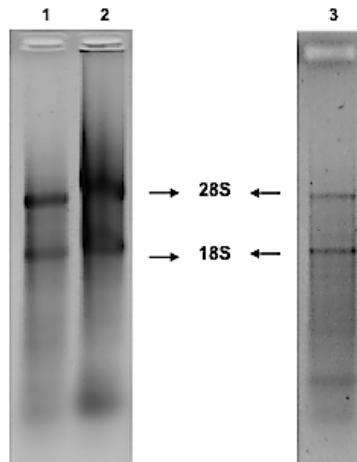


Figura 20. Extracción de los RNA's totales en los tejidos mamarios. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Los RNA's provenientes de un tejido mamario normal (carril 1), de tejido mamario con patología maligna (carril 2) fueron conservados en RNAlater® (Ambion) en donde se pueden observar de manera definida las bandas de los RNA's ribosomales 28S y 18S que indican la integridad de los RNA's obtenidos. Los RNA's de tejido con patología benigna (carril 3) fueron preservados en Trizol (Invitrogen). Cada carril contiene aproximadamente 1 µg de RNA's totales.

Las Tablas XI, XII y XIII muestran los tejidos mamarios normales, benignos y malignos respectivamente que fueron conservados en RNAlater® y en Trizol. La concentración y la pureza obtenida de los RNA's totales extraídos de los tejidos mamarios muestran alta variabilidad en la concentración desde 22 hasta 3635 µg/mL con una Abs 260/280 mayor de 1.7 en la mayoría de los casos indicando buena pureza de los RNA's obtenidos. La Tabla XI muestra que de 4 de 29 muestras de tejido de mama que fueron preservados en Trizol no presentaron una Abs 260/280=1.1 indicando una vez mas la baja pureza de los RNA's obtenidos.

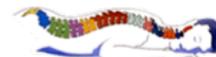


Tabla XI. Cuantificación de los RNA's totales extraídos de los Tejidos Mamaros Normales

Tejido Mamario Normal	Solución conservadora	Cantidad de tejido procesado (mg)	Concentración (µg/mL)	Pureza Abs 260/280
1N	RNAlater®	53	2068.6	1.7
2N	RNAlater®	50	154.5	1.7
3N	RNAlater®	166	1233	1.9
4N	RNAlater®	89	517	1.7
5N	RNAlater®	95	203	1.7
6N	RNAlater®	75	1874	1.9
7N	RNAlater®	126	2164	1.5
8N	RNAlater®	153	1565	1.8
9N	RNAlater®	103	939	1.8
10N	RNAlater®	123	905	1.9
11N	RNAlater®	80	133	1.7
12N	RNAlater®	93	291	1.7
13N	RNAlater®	164	659	1.8
14N	RNAlater®	44	1038	1.9
15N	RNAlater®	122	422	1.7
16N	RNAlater®	122	893	1.7
17N	Trizol	54	508	1.1
18N	RNAlater®	72	122	1.7
19N	RNAlater®	171	1335	1.8
20N	RNAlater®	118	2698	1.8
21N	RNAlater®	87	1896	1.6
22N	RNAlater®	106	1612	1.9
23N	RNAlater®	97	2638	1.9
24N	Trizol	70	161	1.1
25N	RNAlater®	105	728	1.8
26N	Trizol	322	1272	1.8
27N	Trizol	60	336	1.1
28N	Trizol	69	1445	1.1
29N	RNAlater®	129	60.5	1.8

Tabla XII. Cuantificación de los RNA's totales extraídos de los Tejidos Mamaros Benignos

Tejido Mamario Benigno	Solución conservadora	Cantidad de tejido procesado (mg)	Concentración (µg/mL)	Pureza Abs 260/280
1B	Trizol	71	490	1.8
2B	Trizol	74	252	1.9
3B	Trizol	103	543	1.9



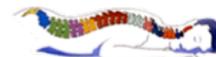


Tabla XIII. Cuantificación de los RNA's totales extraídos de los Tejidos Mamaros Malignos

Tejido Mamario Maligno	Solución conservadora	Cantidad de tejido procesado (mg)	Concentración (µg/mL)	Pureza Abs 260/280
1M	RNAlater®	90	2637	1.9
2M	RNAlater®	90	2637	1.9
3M	RNAlater®	90	2637	1.9
4M	RNAlater®	90	2637	1.9
5M	RNAlater®	177	2076	1.9
6M	RNAlater®	133	2009	1.9
7M	RNAlater®	92	3486	1.9
8M	RNAlater®	154	2995	1.9
9M	RNAlater®	65	2650	1.9
10M	RNAlater®	39	243	1.7
11M	RNAlater®	40	4333	1.7
12M	RNAlater®	41	815	1.9
13M	RNAlater®	34	329	1.7
14M	Trizol	30	656	1.6
15M	RNAlater®	100	912	1.8
16M	RNAlater®	60	1577	1.9
17M	RNAlater®	49	2448	1.5
18M	RNAlater®	40	3286	1.9
19M	RNAlater®	77	2307	1.9
20M	RNAlater®	74	2352	1.6
21M	RNAlater®	96	2268	1.5
22M	RNAlater®	93	224	1.6
23M	RNAlater®	96	2238	1.9
24M	RNAlater®	77	2595	1.9
25M	RNAlater®	95	1605	1.6
26M	RNAlater®	72	3007	1.9
27M	RNAlater®	74	3635	1.8
28M	Trizol	60	720	1.5
29M	Trizol	34	523	1.8
30M	Trizol	50	800	1.0
31M	Trizol	30	64	2
32M	Trizol	30	1496	1.3
33M	Trizol	26	1268	1.8
34M	Trizol	30	1045	1.5
35M	Trizol	40	1112	1.3
36M	Trizol	30	424	1.7
37M	Trizol	20	472	1.2
38M	Trizol	30	424	1.5
39M	Trizol	10	752	1.8
40M	Trizol	30	392	1.4
41M	Trizol	37	215	2
42M	Trizol	20	304	1.0
43M	Trizol	50	1782	1.6
44M	Trizol	10	1720	1.5
45M	Trizol	53	1377	1.8
46M	Trizol	30	1512	1.4
47M	Trizol	40	1864	1.4
48M	Trizol	40	112	1.4
49M	Trizol	10	376	2
50M	Trizol	85	2162	1.9
51M	Trizol	91	1063	1.9
52M	Trizol	23	20	1.3
53M	Trizol	92	1423	1.8
54M	Trizol	94	3956	1.8
55M	Trizol	104	693	1.8
56M	Trizol	221	443	1.5





8.3.2 Amplificación del gen *HOXB13* mediante PCR Punto Final

8.3.2.1 β -actina

Los RNA's totales obtenidos del tejido mamario normal, con patología benigna y maligna se utilizaron para la síntesis de los DNAc's mediante transcripción reversa. Se realizó la reacción de PCR para la amplificación del gen β -actina a partir de los DNAc's obtenidos de tejidos mamaros con la finalidad de corroborar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción de cada uno de los tejidos procesados. Los resultados en la Figura 21 muestran confirman la amplificación de una banda de 276pb que corresponde al gen de β -actina obtenida de los tejidos mamaros en comparación a la que se encuentra en los DNAc's de la línea celular SiHa (+), utilizada como control positivo de la reacción.

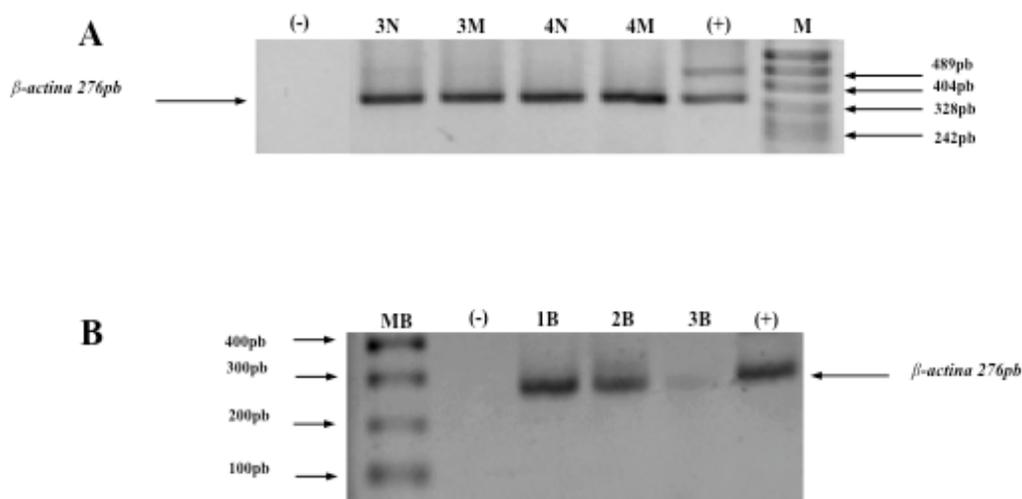


Figura 21. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR a partir de los tejidos mamaros. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol fueron utilizados para llevar a cabo la síntesis a DNAc's a través de transcripción reversa y posteriormente con la reacción de PCR para la amplificación del gen β -actina. En **A** se muestra la electroforesis de un gel de agarosa al 1.2% demostrando la amplificación de una banda de 276pb la cual corresponde a β -actina a partir de los DNAc's obtenidos de tejido mamario normal (N) y patología maligna (M). En **B** se observa la electroforesis realizada a los tejidos mamaros con patología benigna (1B, 2B y 3B). Se logra observar la baja eficiencia de la reacción la muestra 3B El carril (+) contiene la amplificación de un DNAc de la línea celular SiHa utilizado como testigo positivo. El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc blanco, el carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp I* y MB se refiere al marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Bioline).



8.3.2.2 HOXB13

La expresión de una banda de 300pb se observa en los geles de agarosa al 1.2% en la Figura 22 demostrando la amplificación de HOXB13 en algunos de los tejidos mamarios y en la línea celular SiHa utilizada como control positivo. La expresión de HOXB13 no se detectó en ninguna de las muestras benignas. Por otro lado, en los tejidos normales HOXB13 se expresó solo en 5 de las 29 muestras analizadas, sin embargo cabe mencionar que fueron eliminadas del estudio 5 muestras de tejido normal debido a que no presentaban la calidad deseada para el análisis. Con respecto a los tejidos mamarios con patología maligna la expresión de HOXB13 fue observada en 29 de las 56 muestras, descartando 7 muestras de tejido por no presentar un buen estado. Estos resultados muestran claramente una relación positiva en la expresión del gen HOXB13 en los tejidos con patología maligna ($p=0.007$).

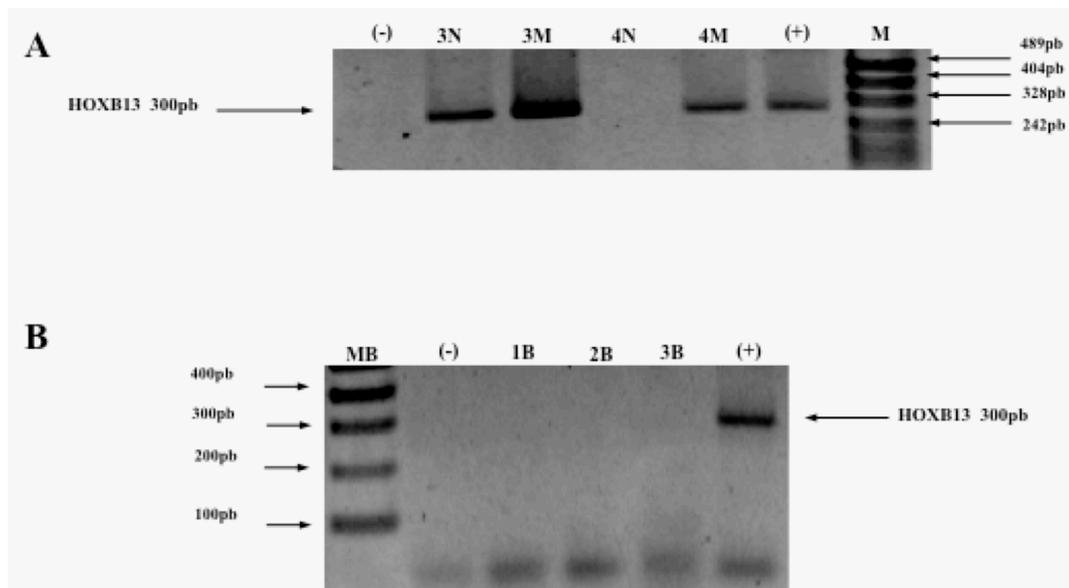


Figura 22. Amplificación del gen HOXB13 en los tejidos mamarios. Los geles de agarosa al 1.2 % muestran la amplificación de HOXB13 en algunas muestras representativas de tejidos mamarios de acuerdo a las condiciones descritas en materiales y métodos. **A.** La banda de amplificación del transcrito de HOXB13 que corresponde a 300pb se observa en algunas muestras normales (3N) y en aquellas que representan a tejidos con patología maligna (3M y 4M). **B.** La expresión de HOXB13 no se observa en los tejidos mamarios con patología benigna (1B, 2B y 3B), en contraste con el testigo positivo SiHa (+). El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc blanco, el carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp I* y MB se refiere al marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Bioline).



En resumen los resultados de la expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios analizados pueden visualizarse en la Figura 23 donde se muestra que el gen HOXB13 se detectó por PCR Punto Final en 5 de los 29 tejidos mamarios normales mientras que no se detectó en los tejidos con patología benigna y se encontró la expresión de dicho gen en 29 de los 56 de los tejidos mamarios malignos.

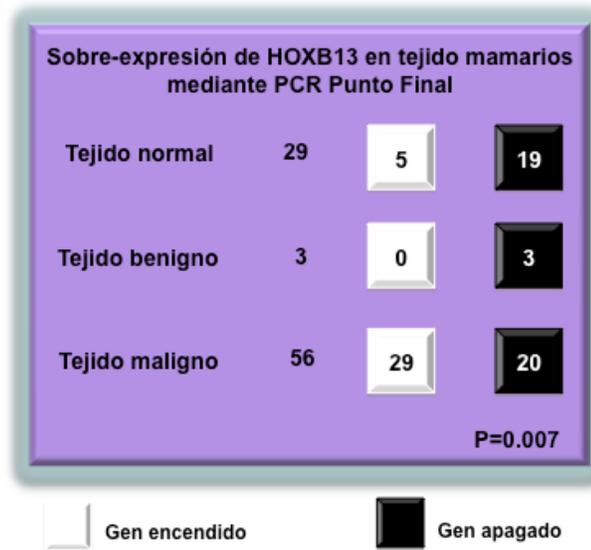


Figura 23. Expresión diferencial del gen HOXB13 en los tejidos mamarios por PCR Punto Final. Matriz de resultados que resume la expresión del gen HOXB13 en los 28 tejidos normales, 3 benignos y 56 tejidos malignos analizados por PCR Punto Final. Se encontró una relación positiva entre la presencia del gen HOXB13 y la presencia de cáncer.

8.3.3 Cuantificación del nivel de expresión del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en los tejidos mamarios

Con las condiciones de PCR Tiempo Real estandarizadas previamente con la línea celular SiHa se prosiguió a la cuantificación de la expresión del gen HOXB13 y el gen β -actina usando los DNAC's de los tejidos mamarios previamente obtenidos y analizados mediante PCR Punto Final. La cuantificación del gen HOXB13 se realizó mediante la amplificación por PCR Tiempo Real de los genes HOXB13 y β -actina en 29 tejidos mamarios normales, 3 tejidos con patología benigna y en 56 tejidos con patología maligna.



Debido a la diferencia en la magnitud de los resultados en la expresión del gen HOXB13 se decidió utilizar los datos en escala logarítmica base 10 para una mejor cuantificación y análisis de los datos así como también se tomó la decisión de utilizar el resultado del ΔC_T de las muestras para posteriores comparaciones estadísticas.

8.3.3.1 *Expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios malignos*

La cuantificación del gen HOXB13 a partir de los DNAs de los tejidos malignos se realizó mediante PCR Tiempo Real. Para lograr lo anterior, una vez obtenidos los valores de C_T para el gen HOXB13 como para el gen de referencia (*β -actina*) se llevó a cabo la normalización de estos valores y se aplicó la fórmula del método $\Delta\Delta C_T$ previamente validado para estas condiciones utilizando el ΔC_T del tejido maligno y como valor calibrador el ΔC_T obtenido de un pool de tejidos mamarios normales. La Tabla XIV muestra la cuantificación de los resultados obtenidos de la expresión del gen HOXB13 en escala logarítmica base 10 demostrando el número de veces que se sobre-expresa el gen HOXB13 solamente en 33 tejidos cancerosos. Los números enteros indican una mayor sobre-expresión del gen HOXB13 en los tejidos malignos comparados con el tejido normal, mientras que los números decimales nos indican el número de veces que se expresa menos en el tejido maligno con respecto al tejido normal. Estos resultados de la cuantificación de los transcritos de HOXB13 mediante PCR Tiempo Real indican que el gen HOXB13 se encuentra con mayor sobre-expresión en la mayoría de las muestras analizadas provenientes de tejido mamario maligno (33 de 56). Los valores de la sobre-expresión del gen HOXB13 comparados con el tejido normal indican que van desde 2.3 veces hasta 132,364.63 veces .



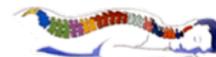


Tabla XIV. Cuantificación Relativa del gen HOXB13 con respecto a Tejido Mamario Normal

Tejido Mamario Maligno	Expresión relativa de HOXB13
2M	5.9539 ± 0.3185
3M	338.0069 ± 79.8348
4M	49.0896 ± 18.1965
6M	3016.5115 ± 1660.6609
8M	14905.3554 ± 11246.2981
9M	953.4652 ± 350.8202
12M	7634.4239 ± 9074.9890
13M	10.7817 ± 9.4909
15M	21.8385 ± 18.5412
16M	132364.6387 ± 57750.4552
17M	2184.2269 ± 453.1524
19M	1491.9860 ± 551.2415
21M	432.7109 ± 155.3051
23M	2995.90 ± 47.9977
24M	53.8437 ± 40.5098
28M	7.1368 ± 0.1402
29M	18.4348 ± 8.8743
34M	6.8290 ± 3.5477
36M	353.2232 ± 39.4484
37M	601.0959 ± 229.8877
38M	1941.1896 ± 1044.9306
39M	3337.47 ± 501.5279
40M	60.6311 ± 12.3744
41M	9.3894 ± 3.5229
42M	40.9637 ± 11.4097
43M	7767.6993 ± 377.8152
44M	2.3359 ± 3.0432
45M	650.1351 ± 103.8909
46M	1016.7999 ± 54.3975
47M	5599.9371 ± 2313.2647
48M	1042.0307 ± 393.35
50M	2659.4758 ± 399.6442
56M	5.2274 ± 0.3811

La Figura 24 muestra la grafica del nivel de expresión en logaritmo base 10 del gen HOXB13 en los tejidos mamaros malignos incluyendo a las líneas celulares MCF-7 y SiHa para observar mejor la diferencia de expresión del gen HOXB13. El valor de 1 corresponde a la expresión en el tejido mamario normal. Los números positivos indican que el gen HOXB13 se expresa más en tejido maligno que en las líneas celulares con respecto al tejido normal, por el contrario lo números negativos indican que el gen HOXB13 se expresa menos en tejido maligno con respecto al normal. El análisis estadístico para la diferencia entre las medias de la expresión relativa de HOXB13 en los tejidos malignos y normales revela que existe una diferencia significativa ($p=0.004$).



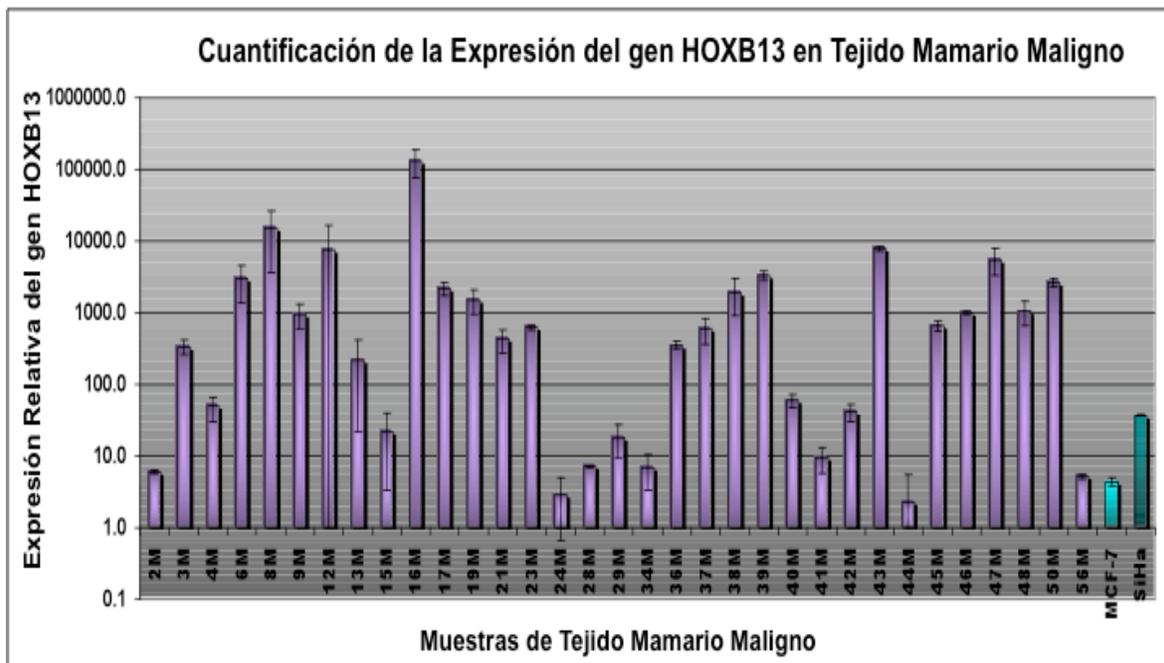
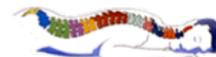


Figura 24. Cuantificación relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en los tejidos mamarios con patología maligna. La cuantificación de la expresión génica de HOXB13 se realizó por triplicado en los genes β -actina y HOXB13 utilizando los DNAc's obtenidos de los tejidos mamarios, usando el método $\Delta\Delta C_T$. La gráfica muestra el nivel de expresión del gen HOXB13 en cada tejido mamario, siendo el valor de 1 el que corresponde a la expresión del tejido normal. Los números positivos indican que la expresión de HOXB13 fue mayor en los tejidos malignos y en las líneas celulares MCF-7 y SiHa con respecto al tejido normal, por el contrario el número negativo indica que la expresión de HOXB13 es menor con respecto al tejido normal.

Por otra parte, el análisis de la expresión del gen HOXB13 utilizando el método ΔC_T se realizó en los tejidos malignos utilizando como valor calibrador el ΔC_T obtenido de la línea celular MCF-7. Lo anterior permitió obtener la cuantificación relativa de la expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios malignos comparada con la línea celular MCF-7. Los valores de expresión para el gen HOXB13 se muestran en la Tabla XV demostrando el número de veces que se sobre-expresa el gen HOXB13 en 33 tejidos con patología maligna. Los números enteros indican mayor sobre-expresión del gen HOXB13 en los tejidos malignos comparados con la línea celular MCF-7, mientras que los números decimales nos indican el número de veces que se expresa menos en el tejido maligno con respecto a la línea celular MCF-7. Estos valores de cuantificación de los transcritos de HOXB13 mediante PCR Tiempo Real nos indican que el gen HOXB13 se encuentra con mayor



sobre-expresión en la mayoría de las muestras (33 de 56) provenientes de tejido mamario maligno. Los valores de sobre-expresión del gen HOXB13 en los tejidos malignos comparados con la línea celular MCF-7 indican que van desde 1.08 veces hasta de veces 33406.42 veces. Con excepción de la muestra 44M que indica que HOXB13 se sobre-expresa 0.5 veces menos comparados con la línea celular MCF-7.

Tabla XV. Cuantificación Relativa del gen HOXB13 con respecto a MCF-7

Tejido Mamario Maligno	Expresión relativa de HOXB13
2M	1.2386 ± 0.0662
3M	1.2386 ± 0.0662
4M	1975.9267 ± 2355.1965
6M	766.3292 ± 427.2734
8M	3715.7275 ± 2846.8959
9M	215.5877 ± 80.5386
12M	1975.9267 ± 2355.1965
13M	2.9880 ± 2.6303
15M	5.0655 ± 4.2796
16M	33406.4247 ± 14469.3154
17M	691.4250 ± 143.4470
19M	472.2936 ± 174.4975
21M	136.9762 ± 49.1624
23M	830.2956 ± 24.1160
24M	14.9224 ± 11.2270
28M	1.6106 ± 0.0316
29M	4.1603 ± 2.0027
34M	1.4207 ± 0.7380
36M	73.4854 ± 8.2069
37M	135.6558 ± 51.8812
38M	438.0893 ± 235.8208
39M	694.3364 ± 104.3391
40M	13.6832 ± 2.7926
41M	1.9534 ± 0.7329
42M	8.5222 ± 2.3737
43M	1616.0127 ± 78.6016
44M	0.5271 ± 0.6867
45M	146.7230 ± 23.4461
46M	211.5377 ± 11.3170
47M	1263.7987 ± 522.0596
48M	235.1664 ± 88.7736
50M	553.2843 ± 83.1430
56M	1.0875 ± 0.0793

Lo anterior puede ser visualizado de una mejor manera en la Figura 25 donde se muestra la grafica del nivel de expresión en logaritmo base 10, siendo el valor de 1 el que corresponde a la expresión en la línea celular MCF-7. Los números positivos indican que el gen





HOXB13 se expresa más en tejido maligno con respecto a la línea celular MCF-7, por el contrario los números negativos indican que el gen HOXB13 se expresa menos en tejido maligno con respecto a la línea celular MCF-7. El resultado obtenido en el análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa entre el valor medio de la expresión relativa de HOXB13 en tejido maligno y la expresión en MCF-7 ($p=0.002$). Cabe recalcar que la expresión en tejido maligno estadísticamente se encuentra cercana a la expresión observada en la línea celular SiHa.

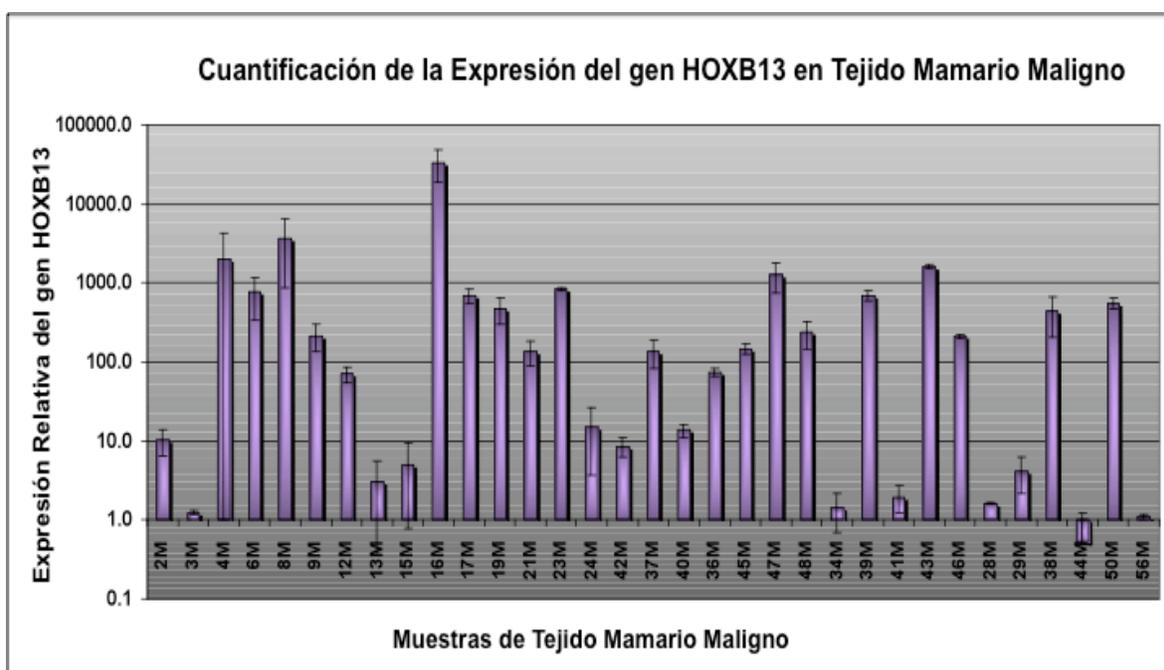


Figura 25. Cuantificación relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en los tejidos mamarios malignos. La cuantificación de la expresión génica de HOXB13 se realizó por triplicado en los genes β -actina y HOXB13 utilizando los DNAc's obtenidos de los tejidos mamarios malignos, usando el método $\Delta\Delta C_T$. La gráfica muestra el nivel de expresión del gen HOXB13 en cada tejido mamario maligno, siendo el valor de 1 el que corresponde a la expresión de la línea celular MCF-7. Los números positivos indican que la expresión de HOXB13 fue mayor en los tejidos mamarios con respecto a la línea celular MCF-7, por el contrario el número negativo indica que la expresión de HOXB13 es menor con respecto a la línea celular MCF-7.



Para analizar la expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios malignos con respecto al tejido mamario normal se decidió agrupar dichas muestras de acuerdo a los diferentes estadios del cáncer mamario. De las 30 muestras analizadas según a la estadificación correspondieron al estadio I (2 de 30), II (14 de 30) y III (10 de 30). En la Figura 26 se muestra la gráfica del nivel de expresión del gen HOXB13 en logaritmo base 10 en los tejidos mamarios malignos de acuerdo a su respectivo estadio incluyendo el nivel de expresión del gen HOXB13 de las líneas celulares MCF-7 y SiHa. Estos resultados muestran claramente que la sobre-expresión del gen HOXB13 se ve aumentada en los tejidos mamarios malignos mientras que la sobre-expresión del gen HOXB13 es menor en las líneas celulares MCF-7 y SiHa. La estadificación de los carcinomas analizados demuestra que el encendido del gen HOXB13 se detectó en la gran mayoría de las muestras (26 de 30), estando presente su expresión desde el estadio I hasta el estadio III. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa para la expresión relativa de HOXB13 entre los diferentes estadios ($p=0.296$).

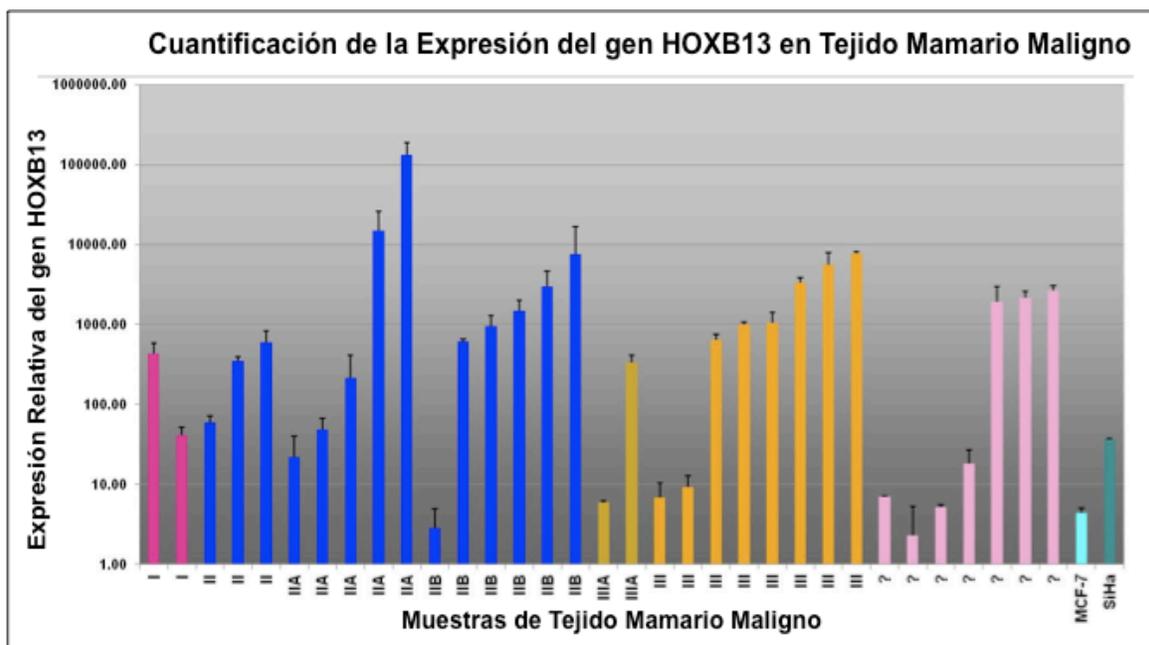


Figura 26. Cuantificación relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en los estadios I-III. La cuantificación de la expresión génica de HOXB13 se realizó por triplicado en los genes β -actina y HOXB13 utilizando los DNAc's obtenidos de los tejidos mamarios, usando el método $\Delta\Delta C_T$. Las barras muestran la cuantificación el nivel de expresión génica de HOXB13 en escala logarítmica base 10 en las muestras de tejido mamario maligno estadio I (rosa), estadio II (azul), estadio III (naranja), estadio desconocido (rosa claro), línea celular MCF-7 (turquesa) y línea celular SiHa (verde oscuro).



Así mismo, como se observa en la Figura 27 se confirmó el resultado obtenido en el análisis por PCR Tiempo Real realizando una comparación múltiple de medianas (prueba de Kruskal-Wallis) obteniendo como resultado que no existían diferencias significativas entre la expresión relativa de HOXB13 con respecto a los diferentes estadios ($p=0.296$). Sin embargo se observa una tendencia en la cual los tejidos mamarios malignos estadio I pudieran tener una menor expresión relativa para este gen. Estos resultados obtenidos apoyan fuertemente que HOXB13 se enciende en estadios tempranos y mantiene su expresión durante el desarrollo del carcinoma mamario.

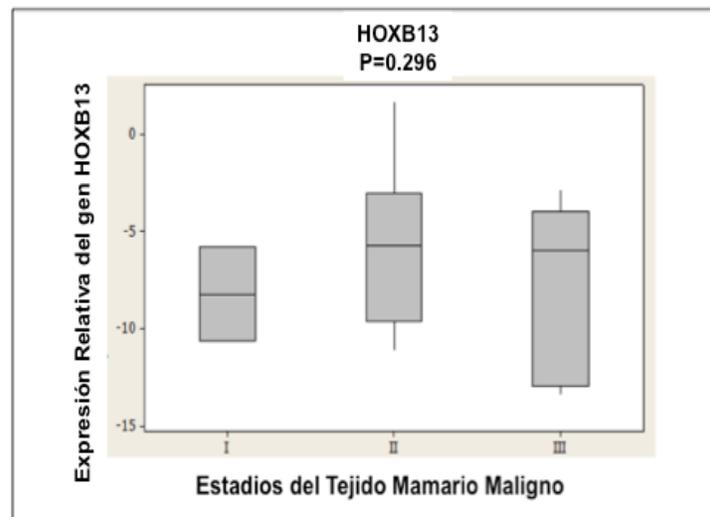


Figura 27. Análisis estadístico de la Cuantificación Relativa por PCR Tiempo Real de la expresión del gen HOXB13 en los distintos estadios del cáncer mamario. La prueba de comparación múltiple de medianas (Kruskal-Wallis) muestra que no se encontraron diferencias significativas entre la expresión relativa de HOXB13 con respecto a los diferentes estadios del tejido mamario maligno ($p=0.296$).

Por otra parte, para analizar en detalle la tendencia observada en los resultados anteriores en la Figura 28A se muestra que cuando se realizó la prueba estadística (estadístico de prueba Z) para comparar los resultados del análisis realizado por PCR Tiempo Real en la población de tejidos mamarios malignos y tejidos mamarios normales se encontró que existe una diferencia significativa entre la expresión relativa de HOXB13 de los tejidos mamarios malignos analizados y en los tejidos mamarios normales ($p=0.004$). Mientras que en la Figura 28B se muestra que cuando se realizó la prueba estadística de



diferencia de diferencia honesta significativa (HSD) de Tukey para comparar la expresión relativa de HOXB13 en tejido mamario normal y en los diferentes estadios tumorales del cáncer de mama, los resultados mostraron que existían diferencias significativas entre los diferentes estadios del cáncer de mama y el tejido mamario normal ($p < 0.0001$) demostrando que la expresión relativa de HOXB13 en el tejido mamario normal es menor que la encontrada en los estadios I, II y III del cáncer de mama. En conjunto estos resultados apoyan fuertemente que el gen HOXB13 se enciende temprano y se mantiene durante el desarrollo del carcinoma.

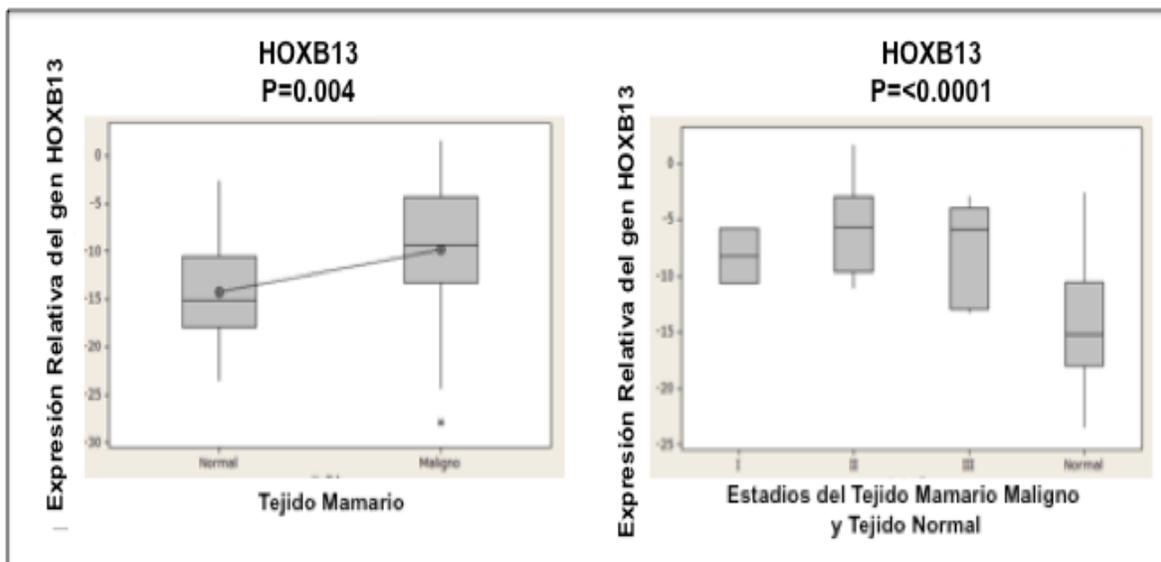


Figura 28. Análisis estadístico de la Cuantificación Relativa por PCR Tiempo Real de la expresión del gen HOXB13 en Tejido Mamario Maligno y Tejido Mamario Normal. A. La grafica de caja muestra que existe diferencia significativa entre los tejidos mamaros malignos y normales ($p=0.004$) obtenido mediante el análisis estadístico realizado (prueba Z) **B.** La prueba de contraste de HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey para la comparación de la expresión relativa de HOXB13 mostró una diferencia significativa entre los diferentes estadios del cáncer mamaro y el tejido mamario normal ($p < 0.0001$).

En resumen en la Figura 29 se muestra la sobre-expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamaros por PCR Tiempo Real que mostró la expresión del gen HOXB13 en 33 de las 56 muestras de tejido maligno, no se detectó dicho gen en las 3 muestras de tejido mamario con patología benigna por lo que este resultado coincidió con lo obtenido por PCR Punto Final.



Asimismo de las 29 muestras analizadas por PCR Tiempo Real correspondientes al tejido mamario normal y que fueron comparadas con la línea celular MCF-7 solo se detectó la sobre-expresión de HOXB13 en 9 muestras de 29. Por lo que el transcrito del gen HOXB13 muestra claramente su expresión en las muestras neoplásicas analizadas con una alta incidencia.



Figura 29. Expresión diferencial del gen HOXB13 en los tejidos mamaros por PCR Tiempo Real. En la gráfica se muestra un resumen de la expresión del gen HOXB13 en muestras de tejidos mamaros utilizando PCR Tiempo Real.

La cuantificación de HOXB13 global se muestra por otra parte, en la Figura 30 con los promedios y las desviaciones estándar de los valores en escala logarítmica de la cuantificación relativa de HOXB13 de los tejidos mamaros malignos y de las líneas celulares MCF-7 y SiHa. Se aprecia como el promedio de los valores obtenidos de la cuantificación relativa de HOXB13 en los tejidos mamaros malignos se encuentra con una mayor sobre-expresión (2087.2 veces) en comparación con el promedio de los valores obtenidos de la cuantificación relativa de HOXB13 en las líneas celulares MCF-7 (4.5 veces) y SiHa (36.7 veces).



El análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa entre la expresión relativa de HOXB13 en los tejidos mamarios malignos en comparación con la línea celular SiHa ($p=0.879$).

Por otro lado, el análisis estadístico mostró claramente que existe una diferencia significativa entre la expresión relativa de HOXB13 en los tejidos mamarios malignos en comparación con la línea celular MCF-7 ($p=0.002$).

Estos resultados claramente demuestran la sobre-expresión de HOXB13 en las muestras con cáncer que apoyan los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Webb, 2007) y con los resultados descritos por Yamamoto y cols. (2003); Svigen & Tonissen (2003); Cantile y cols. (2003) y Ma y cols. (2004).

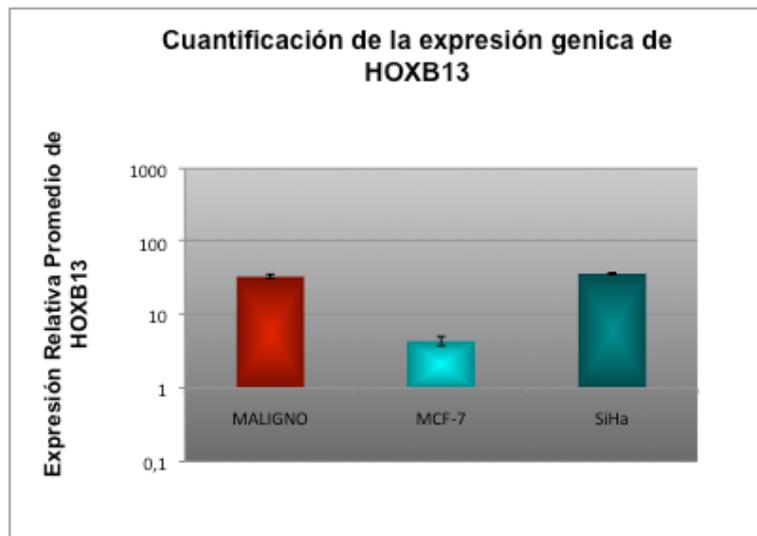


Figura 30. Cuantificación relativa del gen HOXB13 mediante PCR Tiempo Real en los tejidos mamarios con patología maligna. La cuantificación de la expresión génica de HOXB13 se realizó por triplicado en los genes β -actina y HOXB13 utilizando los DNAc's obtenidos de los tejidos mamarios, usando el método $\Delta\Delta C_T$. Las barras muestran la cuantificación promedio del nivel de expresión génica de HOXB13 en escala logarítmica base 10 en las muestras de tejido mamario maligno (rojo), línea celular MCF-7 (turquesa) y línea celular SiHa (verde oscuro).

8.3.3.2 Expresión de marcadores moleculares y del gen HOXB13 en los tejidos mamarios malignos

La sobre-expresión del gen HOXB13 fue comparada con los datos obtenidos en los distintos carcinomas en la expresión de los marcadores moleculares.





Los marcadores moleculares analizados corresponden al receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), a la proteína nuclear Ki67 (marcador de proliferación), a la proteína p53 mutada (p53m), y el receptor de factor de crecimiento epitelial 2 (Her2/neu). En la Tabla XVI se muestran los resultados de los marcadores moleculares 49 tejidos mamarios malignos analizados, de los cuales corresponden en su mayoría al estadio III (12 de 49), en baja proporción al estadio II (19 de 49), y solo tres muestras del estadio I. El análisis estadístico efectuado para relacionar la expresión del gen HOXB13 con la expresión del RE no encontró diferencia significativa alguna ($p=0.664$) como se puede observar en la Figura 31.

Así mismo, la expresión de los marcadores moleculares RP, Ki67 y p53m también fue analizada estadísticamente mediante una regresión lineal. Este análisis no mostró diferencias significativas entre la expresión de HOXB13 y la expresión de los distintos marcadores pronósticos (RP; $p=0.548$, Ki67; $p=0.918$ y p53m; $p=0.538$) respectivamente.

En relación a la expresión del receptor Her2/Neu el resultado demostró también que no se encontró diferencia significativa ($p=0.145$), sin embargo fue posible observar una tendencia en la cual la expresión parece aumentar con el estadio del tumor. De manera similar, se comparó la expresión relativa de HOXB13 en tumores clasificados como RE (+) y RE (-) con respecto al receptor Her2/Neu. El resultado indicó que no se logró encontrar una diferencia significativa en tumores que expresaron HOXB13 RE (+) con respecto al marcador Her2/Neu ($p=0.006$). De la misma manera, la expresión relativa de HOXB13 en tumores clasificados como RE (-) con respecto al marcador Her2/N los resultados indicaron que no se encontró diferencia significativa ($p=0.828$).

En cuanto a la estadificación de los carcinomas analizados en la Tabla XVI se puede observar que el encendido de HOXB13 se detectó en la gran mayoría de las muestras (33 de 56), estando presente su expresión desde el estadio I hasta el estadio III. Estos resultados apoyan fuertemente que HOXB13 se enciende temprano y se mantiene durante el desarrollo del carcinoma.





Tabla XVI. Expresión de marcadores moleculares y del gen HOXB13

Tejido Mamario Maligno	Estadio	RE	RP	Ki67	p53	Her2/Neu	HOXB13
1M	IIA	(+)	90%			(-)	(-)
2M	IIIA	(+)					(+)
3M	IIIA	(-)	(-)			++	(+)
4M	IIA	(-)	(-)			++	(+)
5M	IIA	(-)	2%			(-)	(-)
6M	IIB	(+)					(+)
7M	IIA	(-)	(-)			++	(-)
8M	IIA	(-)	(-)			(-)	(+)
9M	IIB	(-)	(-)			(-)	(+)
10M	I	(+)					(-)
11M	IIA	(+)	80%			(-)	(-)
12M	IIB	(+)					(+)
13M	IIA	(+)	100%			(-)	(+)
14M	?						(-)
15M	IIA	(+)	100%			(-)	(+)
16M	IIA						(+)
17M	?	(+)					(+)
19M	IIB	(+)	20%			+	(+)
20M	?	(+)					(-)
21M	I	(+)					(+)
22M	IIA	(-)	(-)			(-)	(-)
23M	IIB	(-)	(-)			+++	(+)
24M	IIB	(+)					(+)
28M	?						(+)
29M	?	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
30M	?						(-)
31M	?	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
32M	III	(-)	100%+++	40%++++	80%+++	1+	(-)
33M	?	(-)	(-)	(-)	60%+++	(-)	(-)
34M	III	(-)	(-)	100%++++	100%++++	0	(+)
35M	III	30%++	20%++	(-)	(-)	0	(-)
36M	II	(-)	10%+++	5%++	(-)	2+	(+)
37M	II	(-)	(-)	40%	100%	0	(+)
38M	?	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
39M	III	(-)	(-)	(-)	100%+++	0	(+)
40M	II	60%+	70%+	(-)	(-)	0	(+)
41M	III	(-)	(-)	(-)	90%+++	0	(+)
42M	I	90%+++	90%+++	10%+++	(-)	0	(+)
43M	III	60%+++	40%+++	(-)	80%++++	0	(+)
44M	?	(-)	(-)	10%+++	(-)	(-)	(+)
45M	III	(-)	100%+++	30%+++	10%++	2+	(+)
46M	III	(-)	(-)	40%++	100%++++	0	(+)
47M	III	(-)	(-)	90%++++	100%++++	3+	(+)
48M	III	15%+	20%++	(-)	(-)	3+	(+)
50M	?						(+)
51M	?						(-)
52M	?						(-)
53M	?						(-)
56M	?						(+)



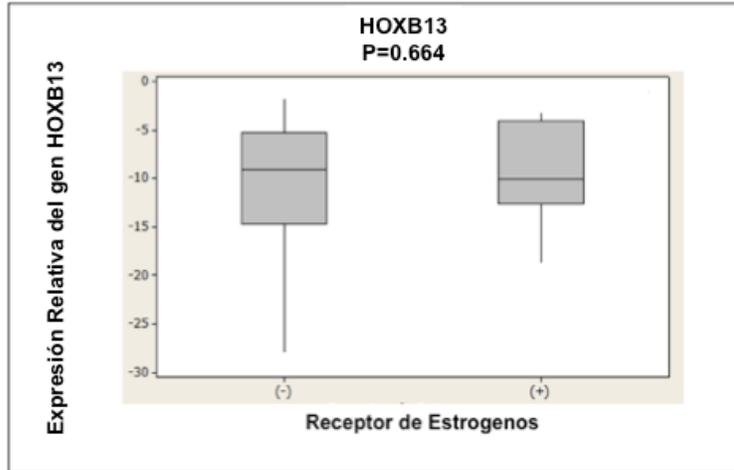


Figura 31. Análisis estadístico de la Cuantificación Relativa por PCR Tiempo Real de la expresión del gen HOXB13 y el estado de RE (Receptor de Estrógenos). La prueba de comparación múltiple de medianas (Kruskal-Wallis) mostró que no se encontraron diferencias significativas entre la expresión relativa de HOXB13 con respecto al RE ($p=0.664$).



9. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis se realizó la detección y cuantificación de la expresión del gen HOXB13 mediante PCR Punto Final y PCR Tiempo Real respectivamente en las líneas celulares y tejido mamario con y sin patología maligna. Las muestras provenientes de tejidos mamarios incluyeron 56 muestras con patología maligna y 29 muestras de tejido normal y tres con patología benigna. Para llegar a este propósito, se estandarizaron las condiciones de amplificación de la RT-PCR punto final seleccionando las líneas celulares SiHa y MCF-7 debido a que se ha descrito que estas líneas celulares expresan el gen HOXB13 (Alami *et al.*, 1999). Para ello, se extrajeron los RNA's totales mediante la técnica de Trizol a partir de paquetes celulares provenientes de líneas celulares, que fueron convertidos a DNAc's mediante una reacción de retrotranscripción reversa tal como se especifica en la sección de materiales y métodos. La calidad de los RNA's totales fue analizada mediante su visualización en un gel de agarosa al 0.8%, mostrando la integridad de las bandas 28S, 18S y 5S de RNA ribosomal, además, la calidad y cantidad de los RNA's fue verificada y cuantificada mediante espectrofotometría. Se observó la integridad de buena calidad de los RNA's tanto de los obtenidos de los paquetes celulares de SiHa y MCF-7. La transcripción reversa se realizó a partir de 5 µg de los RNA's totales obtenidos y fue validada mediante amplificación del gen β -actina cuyo control endógeno de la reacción mostró la presencia de la banda esperada a 276pb. Excepcionalmente, los RNA's obtenidos en SiHa y en MCF-7 resultaron altamente eficientes ya que para la amplificación de este gen en las líneas celulares, aun con una dilución 1/10 de los DNAc's mostraron bandas de amplificación prominentes. Lo anterior permitió demostrar que la reacción de retrotranscripción fue exitosa y la síntesis de los DNAc's se realizó eficientemente en las líneas celulares utilizadas.

El tamaño de las bandas amplificadas del gen HOXB13 así como β -actina fue calculada realizando una amplificación virtual con el programa AmplifX 1.37, utilizando las secuencias y los oligonucleótidos iniciadores descritos en la sección de Materiales y Métodos. Para lo cual, la amplificación en monoplex se realizó con los DNAc's de la línea celular SiHa y un testigo negativo para la reacción en ausencia de DNAc's, además, se amplificó el gen β -actina como control interno de cada reacción. Los resultados obtenidos en la estandarización de las condiciones de amplificación corroboraron la presencia de la





banda de 300pb correspondiente al gen HOXB13, concordando con lo previamente descrito por Alami y cols. (1999).

Adicionalmente, se utilizaron los DNAc's de la línea celular MCF-7 para estandarizar la amplificación de HOXB13. La amplificación de HOXB13 en los DNAc's de las células MCF-7 mostró buena expresión de los transcritos de HOXB13 lo que concuerda con lo descrito por los diferentes autores (Chariot *et al.*, 1995 y Russo *et al.*, 2001) quienes describieron la expresión de genes HOX en esta línea celular incluyendo HOXB13.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación del gen HOXB13 por PCR Punto Final en las líneas celulares, se llevó a cabo la estandarización de la reacción de PCR Tiempo Real donde se utilizaron los oligonucleótidos con sondas Taqman MMG® de la compañía Applied Biosystem para los genes HOXB13 y β -actina. Primeramente, se decidió utilizar la línea celular SiHa debido a la alta eficiencia demostrada en los resultados de PCR punto final por lo que se realizó una curva de calibración estándar para cada uno de estos genes utilizando a la línea celular antes mencionada, para determinar la eficiencia de la reacción de PCR con los oligonucleótidos y así establecer el umbral de detección para la fluorescencia. Los valores obtenidos de C_T 's para el gen HOXB13 fueron normalizados con el gen β -actina, así como con la eficiencia de la reacción de PCR, y posteriormente se comparó contra valores obtenidos de un pool de tejido mamario normal los cuales fueron confirmados patológicamente por el Dr. Juan Araiza Chavéz. Los resultados obtenidos cuantitativamente mediante PCR Tiempo Real mostraron una sobre-expresión del gen HOXB13 de hasta 36.72 veces en la línea celular SiHa, mientras que en la línea celular MCF-7 se encontró una expresión relativa de hasta 4.45 veces. Debido a que evidentemente la línea celular SiHa mostró una mayor expresión relativa comparada con la obtenida en MCF-7 se decidió tomar como control positivo a esta línea celular para posteriores análisis por PCR Tiempo Real.

Después de la detección y cuantificación de HOXB13 en las líneas celulares, se realizó la extracción de los RNA's totales de las muestras de tejidos mamarios con y sin patología maligna. Los RNA's totales de las muestras de tejidos mamarios se obtuvieron mediante la misma técnica utilizada para las líneas celulares. De la misma manera que los RNA's obtenidos de las líneas celulares, se corroboró la integridad de la pureza de los RNA's totales mediante visualización y espectrofotometría. Los tejidos conservados en RNAlater® mostraron una calidad muy similar a la que se obtuvo de los paquetes celulares de SiHa y MCF-7. La pureza de los RNA's totales estimada mediante una Abs 260/280 fue generalmente de 1.6 a 1.9, y la RT-PCR del gen β -actina fue similar cualitativamente en todas las muestras. En contraste, los tejidos mamarios malignos que fueron preservados,





transportados y almacenados en Trizol no mostraron una adecuada integridad de los RNA's totales en geles de agarosa así como en la pureza determinada mediante la relación $Abs\ 260/280=1$. Estos resultados muestran claramente la mejor preservación de los RNA's totales en los tejidos almacenados en RNAlater® en comparación con Trizol.

El análisis de la expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios mediante PCR punto final fue validada en paralelo utilizando como testigo positivo la amplificación del gen HOXB13 correspondiente en los DNAc's de la línea celular SiHa y una reacción carente de DNAc's como control negativo, el cual contenía solamente los reactivos para llevar a cabo la amplificación. Los controles en la reacción de PCR nos permiten descartar errores técnicos durante la realización de la misma, ya sea la falta de uno o más reactivos, o la contaminación cruzada entre muestras y el control positivo (Barrera *et al.*, 1993). Adicionalmente, se realizó a la par la amplificación de β -actina como control interno ya que de esta forma se descartaron aquellas amplificaciones negativas en las cuales el gen β -actina no tuviera una expresión cualitativamente parecida al control positivo (línea celular SiHa) y en todas las muestras se verificó el peso molecular de la banda de amplificación obtenida utilizando un marcador de peso molecular. La presencia de la banda de 300pb para el gen HOXB13 en la línea celular SiHa, así como la amplificación de la banda correspondiente a β -actina, y la ausencia de estas bandas en el control negativo demostraron que los DNAc's utilizados eran de buena calidad.

Interesantemente, la expresión diferencial del gen HOXB13 por PCR Punto Final se encontró predominantemente encendido en las muestras neoplásicas ($p=0.007$). El encendido de HOXB13 se logró detectar en 29 muestras malignas del total de 56, estando presente desde el estadio I hasta el estadio III. Estos resultados apoyan a los obtenidos por Webb- Vargas (2007) en un análisis PCR Punto Final en donde se encontró una fuerte asociación entre la presencia del mensajero de este gen y la presencia de cáncer de mama ($p=0.0001$), en la mayoría de los adenocarcinomas mamarios analizados (14 de 15).

Una vez estandarizada y validada la reacción de PCR Tiempo Real, se prosiguió a utilizar los DNAc's obtenidos previamente de los RNA's de las muestras de tejidos mamarios, para realizar el análisis de la expresión relativa de HOXB13 mediante PCR Tiempo Real. Los valores obtenidos de C_T 's para el gen HOXB13 fueron de igual forma normalizados con el gen β -actina, y se comparó contra los valores obtenidos del pool de tejido normal. Los resultados obtenidos con PCR Tiempo Real corroboran a los encontrados con PCR Punto Final demostrando que este ensayo es más sensible ya que la detección del mensajero de HOXB13 se mostró en 33 de 56 tejidos mamarios malignos, con una mayor sobre-expresión de HOXB13 encontrando valores que van desde 2.2 hasta





132,000 veces en las muestras mamarias con patología maligna comparadas con el pool de tejidos normales. El análisis estadístico de la sobre-expresión de HOXB13 en tejidos malignos comparados con el tejido normal presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0004$). Desafortunadamente, en los tejidos mamarios con patología benigna no se encontró sobre-expresión del gen β -actina, ni de HOXB13, por lo que estos tejidos fueron descartados del análisis de PCR Tiempo Real. Los valores de C_T 's para el gen HOXB13 fueron de igual forma normalizados con el gen β -actina, y se compararon con los valores obtenidos de línea celular MCF-7. Los resultados indicaron que HOXB13 presentó una expresión relativa desde 1.08 hasta 33, 000 veces, mayor que el obtenido en MCF-7. Estos resultados son congruentes ya que la línea celular MCF-7 proviene de un adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo por lo que la expresión de HOXB13 es menor que cuando se compara con tejidos normales.

La sobre-expresión de HOXB13 en los tejidos mamarios malignos detectada en esta tesis es muy relevante, ya que diversos estudios realizados en cáncer de mama y endometrio encontraron que este gen está relacionado a una alta invasibilidad del tumor (Zhao *et al.*, 2004 y Ma *et al.*, 2006).

La expresión de HOXB13 obtenida en el tejido mamario concuerda con lo descrito por otros autores como Yamamoto y cols. (2003); Svingen & Tonissen (2003); Cantile y Ma cols. (2003); y Ma y cols. (2004), quienes detectaron la expresión nula de HOXB13 en tejido mamario normal, con la excepción de un subgrupo de muestras normales en las que este gen se expresó en baja concentración en la unidad ducto-lobular. Asimismo, Cantile y Ma en el 2003 y 2004 muestran una asociación entre la presencia de cáncer y la sobre-expresión de HOXB13, distinguiéndose su expresión en adenocarcinomas ductales *in situ* y en carcinoma ductal invasivo mientras que no se detecta esta expresión en células de epitelio mamario normal. Por otro lado, el análisis de expresión de HOXB13 con microarreglos correlacionó la sobre-expresión de este gen, con la disminución de la expresión del receptor B de IL-17, en recurrencia del cáncer de mama ductal al ser tratado con Tamoxifen, que es el agente antiestrogénico que se administra con mayor frecuencia a las mujeres que padecen cáncer de mama, tanto en etapa temprana como en metástasis positiva para los receptores hormonales. El tamoxifen funciona como un inhibidor competitivo del estrógeno al unirse al receptor y no tiene efecto sobre las células carentes de expresión de receptores estrogénicos. La mayor parte de las pacientes presenta tumores mamarios que son RE+, por lo que se les administra el tamoxifen. Sin embargo, el 40% de los tumores RE+ eventualmente desarrollan resistencia al tamoxifen, lo que lleva a la progresión de la enfermedad (Ma *et al.*, 2004).





Por otro lado, la expresión de HOXB13 en la línea celular MCF-10A -de fenotipo normal- reduce las uniones de tipo epitelial y al tratarse con factor de crecimiento epidermal (EGF), aumentó la movilidad y la invasión *in vivo*. La expresión ectópica de HOXB13 en la línea celular de cáncer mamario MCF10A potencia la migración e invasión celular inducida por factores de crecimiento epidérmico (EGF), lo que sugiere que HOXB13 pueda contribuir directamente a la invasión y metástasis tumoral. Se indica que HOXB13 también puede tener un efecto directo en la señalización de los RE y que el gen HOXB13 puede estar involucrado directa e indirectamente en la modulación de las cascadas de señalización de los receptores de estrógeno (Ma *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha encontrado que este gen se sobre-expresa al haber exposición a estrógenos en líneas celulares de cáncer de endometrio, respondiendo de manera dependiente a tiempo y dosis (Zhao *et al.*, 2005). La sobre-expresión de HOXB13 encontrada en los tejidos mamaros malignos no concuerda con el estudio de Makiyama y cols. (2005), quienes no detectaron una sobre-expresión significativa de este gen en las muestras de cáncer mamario analizadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que HOXB13 se enciende temprano y se mantiene durante el desarrollo del carcinoma, lo que lo postula como un probable biomarcador molecular. Este gen se encontró encendido tanto en muestras positivas como negativas al receptor de estrógeno (RE), contrastando con lo descrito por Rodríguez y cols. (2006) que mostraron la ausencia de expresión de HOXB13 en tejido y líneas celulares de cáncer de mama positivos para RE posiblemente debida a la metilación de su promotor.

Diversos estudios coinciden en que la expresión de HOXB13 se encuentra relacionada con diversas patologías malignas como Yamashita y cols, que en el 2006, encontraron mediante PCR Tiempo Real la sobre-expresión de este gen en más de 300 veces (sin especificar los valores exactos) en líneas celulares en comparación con células de epitelio normal de ovario. Esto apoya a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en tejido ovárico con patología maligna donde la sobre-expresión de HOXB13 se incrementa más de cuatro mil veces con respecto al tejido ovárico con patología benigna en un estudio realizado por PCR Tiempo Real (Cuaranta- Monrroy, 2008).

Por otra parte, se sabe que la expresión de los genes del complejo HOXB requiere de la fase S (Fiseher & Méchali, 2003) concordando con la posible expresión de HOXB13 limitada a células en proliferación del epitelio mamario, ya sea durante la fase lútea en cada ciclo menstrual, o en los carcinomas de la mama.

Adicionalmente, HOXB13 se encuentra readicionado o involucrado en el proceso de cicatrización, aunque el mecanismo no se encuentra bien estudiado, se ha encontrado que la





sobre-expresión de HOXB13 produce varias anormalidades fenotípicas en tejido epidérmico bien diferenciado en modelos murinos adultos, mientras que en modelos murinos fetales se ha encontrado que HOXB13 tiene funciones proapoptóticas y antiproliferativas durante el desarrollo de la médula espinal caudal y de las vértebras de la cola (Mack *et al.*, 2005).

La expresión de los marcadores moleculares RE, RP, Ki67, p53m y Her2/neu no mostró correlación específica y/o significativa con la expresión de HOXB13. El análisis realizado indicó que no se presentaron diferencias significativas entre los 49 carcinomas que contaban con esta información. Este resultado concuerda con lo descrito por Wang y cols. en el 2007 quienes no encuentran relación entre el RE y la expresión de HOXB13. Esto podría sugerir que la asociación entre malignidad y la expresión es independiente de los biomarcadores analizados, por lo que probablemente actúan en una vía de señalización distinta que requiere de un análisis más profundo y que necesita confirmarse en un mayor número de muestras que cuenten con la presencia de estos marcadores.





10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que:

1. La amplificación y cuantificación del gen HOXB13 en los DNAc's obtenidos de las células SiHa y MCF-7 mostró una sobre-expresión de HOXB13 de 36.7 veces en SiHa mientras que MCF-7 mostró solamente 4.5 veces.
2. La expresión del gen HOXB13 por PCR Punto Final se encontró en la mayoría de las muestras de tejido mamario maligno analizadas (29 de 56), desde el estadio I al III, con una fuerte correlación con la presencia de malignidad; ya que no se detectó la sobre-expresión de HOXB13 en ningún tejido con patología benigna y se detectó solamente en 5 de 29 tejidos mamarios normales.
3. La cuantificación relativa por PCR Tiempo Real en las muestras con patología maligna en comparación con las muestras mamarias normales mostró la sobre-expresión de HOXB13 en 33 de 56 muestras con valores que van desde 2.3 a 132,364.63 veces estando presente su expresión desde el estadio I hasta el estadio III, demostrando que existe una diferencia significativa con la expresión relativa de HOXB13 ($p=0.004$) en los tejidos mamarios malignos comparada con los tejidos mamarios normales.
4. La cuantificación relativa por PCR Tiempo Real en las muestras con patología maligna en comparación con la línea celular MCF-7 mostró la sobre-expresión de HOXB13 en 33 de 56 muestras con valores que van desde 1.08 a 33,406.42 veces demostrando que existe una diferencia significativa comparada con la expresión relativa de HOXB13 en MCF-7 ($p=0.002$).
5. La expresión de marcadores moleculares pronósticos obtenidos en los tejidos mamarios malignos con RP, Ki67, p53 y Her2/neu no mostraron diferencias significativas entre la expresión de HOXB13 y la expresión de estos. RP ($p=0.548$) Ki67 ($p=0.918$) p53 ($p=0.538$) y Her2/Neu ($p=0.145$). Asimismo, la expresión del marcador molecular RE tampoco mostró ninguna correlación específica y/o significativa con la expresión del gen HOXB13 en los tejidos mamarios malignos al no encontrar diferencia estadística significativa alguna ($p=0.664$).





6. La sobre-expresión de HOXB13 no mostró diferencia significativa en los tumores clasificados como RE+ y RE- con respecto al receptor Her2/Neu. RE+ y Her2/Neu ($p=0.006$), RE- y Her2/Neu ($p=0.828$).





11. PERSPECTIVAS

Estos resultados muestran la sobre-expresión de HOXB13 en tejidos mamarios con patología maligna en la población mexicana, lo que permite la posibilidad de utilizar a la proteína HOXB13 como un biomarcador molecular en el diagnóstico de muestras de cáncer de mama, para lo que se proponen las siguientes estrategias:

1. Corroborar la presencia de la proteína HOXB13 en los tejidos mamarios con patología maligna mediante Western Blot.
2. Analizar la presencia topográfica mediante inmunohistoquímica de la proteína de HOXB13 en los tejidos mamarios con patología maligna y compararlos con tejidos mamarios sin patología.
3. Analizar la correlación de la expresión de HOXB13 con el subtipo histopatológico, la respuesta a tratamiento y la evaluación del mismo mediante un análisis prospectivo.
4. Evaluar la presencia de anticuerpos contra la proteína HOXB13 en suero de los pacientes con patología maligna, en comparación con pacientes sanos y con patología benigna de mama.
5. Analizar un mayor número de muestras de tejidos mamarios sanos, con patología maligna y con patologías benigna con un análisis exhaustivo de los marcadores moleculares presentes.





12. LITERATURA CITADA

- Abba MC, Drake JA, Hawkins KA, Hu Y, Sun H, Notcovich C, Gaddis S, Sahin A, Baggerly K, Aldaz CM. 2004. Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression. *Breast Cancer Res* 6(5): R499-513.
- Abate-Shen C. 2002. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2: 777-785.
- Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, Stornaiuolo A, Nigro V, Simeone A, Boccinelli E. 1989. The Human Hox gene family. *Nucleic Acids Res*. 17: 10385-10402.
- Afonina E, Neumann M, Pavlakis GN. 1997. Preferential binding of Poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J Biol Chem*. 272(4):2307-2311.
- Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clause N. 1999. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257(3): 738-745.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Chapter 23. Cancer. Editorial Garland Science.
- Almasri NM, Hamad M. 2005. Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Res* 7(5):R598-604.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO) Expert Panel. 1996. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Report of the ASCO expert panel. *J Clin Oncol*. 14: 2843-2847.
- Anderson BO, Shyyan R, Eniu A, Smith R, Yip CH, Bese N, Chow L, Masood S, Ramsey S, Carlson R. 2006. Breast Cancer in Limited-Resource Countries: An Overview of the Breast Health Global Initiative 2005 Guidelines. *The Breast Journal*. Vol 12. Suppl. 1:S3-S15.
- Arpino G, Brardou VJ, Clark GM, Elledge RM. 2004. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: Tumor characteristics and clinical outcome. *Breast cancer Res* 6:R149-R156.
- Baines C. 2000. Screening for breast Cancer: How useful are clinical breast examination? *J Natl Cancer Inst* 92:1002-1006.





- Barrera SHA, Ortiz LR, Rojas MA, Reséndez PD. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo. Conacyt* 18(108):50-60.
- Barron A, Bermejo L, Castro I. 1997. El receptor de estrógenos y la glándula mamaria. *Revista de Investigación clínica* 49:515-528.
- Beaulieu N, Bloom D, Bloom R. 2009. "Breakaway :The global burden of cancer-challenges and opportunities". The Economist intelligence unit. The Economist.
- Brandan ME, Villaseñor-Navarro. 2006. Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología* 1(3):147-162.
- Boyle P, Levin B. 2008. "World Cancer Report 2008". World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Carlson MB. 2005. Embriología Humana y del Desarrollo. Elsevier. pp. 393-427.
- Cantile M, Cindolo L, Napodano G, Altieri V, Cillo C. 2003. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. *Oncogene*. 22: 6462-6468.
- Cazal C. 2004. Estudo da expressão dos genes HOXB13 e HHEX em carcinomas epidermóides de boca através das técnicas de RT-PCR e Hibridização in situ [Tese de Doutorado]. São Paulo: Facultad de Odontologia da USP.
- Cillo C, Papageorgiou S. Ed. 2006. Desregulation of the HOX Gene Network and Cancer. HOX Gene Expression. Cap 9:121-133. Editorial Springer New York.
- Colomer R, Ruibal A, Genolla J. 1989. Circulating CA15.3 levels in the postsurgical follow-up of breast cancer patients and in non-malignant diseases. *Breast Cancer Res Treat* 13(2):123-33.
- Cotran R, Kumar V, Collins T. 1999. Patología estructural y funcional. Editorial McGraw-Hill Interamericana. pp. 1137-1164.
- Crooks GM, Fuller J, Petersen D. 1999. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 94: 519:528.
- Cuarata-Monrroy, I. 2008. Sobre-expresión de los genes HOXA10 transcrito 2, HOXA11 y B13 en tejidos ováricos con patología maligna. Tesis de Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Cuerda Calero F. Factores de riesgo en Ginecología Oncológica Hospital Materno-Infantil. La Paz. Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid.





- Chang L. 2002 “The New York Times. Grandes logros de los genios de hoy. Científicos en el trabajo. 50 fascinantes aportaciones de superestrellas científicas. Carlos Cordón-Cardo. El pionero en el cáncer sigue las huellas genéticas, por Jane E. Brody” MacGraw-Hill. Interamericana Editores S.A de C.V.
- Chariot A, Moreau L, Senterre G, Sobel ME, Castronovo V. 1995. Retinoic acid induces three newly cloned HOXA1 transcripts in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 215(2): 713-720.
- Chen F, Capecchi MR. 1999. Paralogous Mouse HOX genes, Hoxa9, Hoxb9 and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:541-546.
- Daftary GS, Taylor HS. 2006. Endocrine Regulation of HOX Genes. *Endocrine Reviews*. 27(4): 331-355.
- Dickersin K. 1999. Breast screening in women aged 40-49 years: Wath next? *Lancet* 353:1896-1897.
- Donegan WL. 1993. Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer Supplement* 70:1755-1764.
- Dong L, Wang W, Wang F, Stoner M, Reed J, Harigai M, Samudio I, Kladd MP, Vyhidal C, Safe S. 1999. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expresión by 17 β -estradiol in breast cancer cell. *J Biol Chem*. 274(45): 32099-32107.
- Economides KD, Capecchi MR. 2003. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral préstate. *Development* 130:2061-9.
- Economides KD, Zeltser L, Capecchi MR. 2003. HOXB13 mutation cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae. *Dev Biol* 256:317-30.
- Elston CV, Ellis IO. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer the value of histological grade in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19:403-408.
- Esteva FJ, Cheli CD, Fritsche H, Fornier M, Salomon D, Thiel RP, Lufner D, Ghani F. 2005. Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Cancer Res* 7:R436-R443.
- Esteva FJ, Hortobagyo GN. 2004. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:109-118.





- Etchart M. 1996. Capítulo 7: Anatomía Patológica de la Mama en Lecciones de Anatomía Patológica. Editado por B. Chuaqui. Ediciones Universidad Católica de Chile. Accedido en Abril, 2007. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/AnatomiaPatologica/Indice.html>
- Favier B, Dolle P. 1997. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod.* 3(2):115-31.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002. Cancer incidente, mortality and prevalence worldwide. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Lyon: IARC Press.
- Fisher D, Mechali M. 2003. Vertebrate HoxB expresión requires DNA replication. *EMBO J.* 22(14):3737-48.
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O' Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. 2000. Pronostic factors in breast cancer. Collage of American Pathologist Concensus Statment. 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:966-978.
- Franco- Marina, Lozano FR, Villa B, Soliz P. 2006. La Mortalidad en México, 2000-2004 “ Muertes Evitables: magnitud, distribución y tendencias”. Dirección General de Información en Salud, Secretaría de Salud.
- Friedmann Y, Daniel CA, Strickland P, Daniel CW. 1994. Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Res.* 54(22):5981-5.
- Friedmann Y. 1995. Expression and developmental role of homeobox containing genes Turing Mouse mammary gland morphogenesis. In *Biology*. Santa Cruz, CA: University of California.
- Foster RG, Peirson SN, Butler JN. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data análisis. *Nucleic Acids Research.* 31(14):e73.
- Fu SW, Schwartz A, Stevenson H, Pinzone JJ, Davenport GJ, Orenstein JM, Gutierrez P, Simmens SJ, Abraham J, Poola I, Stephan DA, Berg PE. 2003. Correlation of expresión of BP1, a homeobox gene, with estrógeno receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5(4):R82-7.
- Gaffey MJ, Mills SE, Frierson HF, Zarbo RJ, Boyd JC, Simpson JF, Weiss LM. 1995. Mudallary carcinoma of the breast: Interobserver variability in histopathologic diagnosis. *Mod Pathol* 8:31-38.





- Ganong, WF. 1994. Fisiología Médica. 14^o Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, DF.
- García-Bellido, A. 1997. Homeotic and atavistic mutations in insects. *Amer. Zool.* 17, 613-30.
- Gasparini G, Pozza F, Harris A. 1993. Evaluating the potential usefulness of new prognostics and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 85:1206-1219.
- Geddes M, Parkin DM. 1993. Cancer in Italian migrants populations. IARC Scientific publication 123.
- Gehring WJ. 1987. Homeoboxes in the study of development. *Science* 236, 1245-52.
- Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. 1994. Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 437-526.
- Ghadirian P. 1998. Sociodemographic characteristics, smoking, medical and family history and breast cancer. *Cancer Detect Prev* 22:485-494.
- Goodman FR, Majewski F, Collins AL, Scambler PJ. 2002. A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly. *Am J Hum Genet* 70(2):547-555.
- Gómez-Navarro J, Arafat W, Xiang J. 2000. Gene therapy for carcinoma of the breast: Proapoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res* 2:32-44.
- Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. 2005. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.* 205:154-71.
- Hadden JW. 1995. The immunology of breast cancer. *Clin Immunother* 4:279-300.
- Hadden JW. 1999. The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 21:79-101.
- Hamada J, Omatsu T, Okada F, Furuuchi K, Okubo Y, Takahashi Y, Tada M, Miyazaki YJ, Taniguchi Y, Shirato H, Miyasaka K, Moriuchi T. 2002. Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. *Int J Cancer.* 93(4):516-25.
- Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Tsutsumida A, Furuuchi K, Aoyama T, Sugihara T, Morouchi T. 2002. Transduction of HOXD3-antisense into human melanoma cells results in decreased invasive and motile activities. *Clin Exp Metastasis.* 19(6):503-11.





- Harris JR, Morrow M, Bonadanna G. 1993. Cancer of the breast. In: Cancer principles and Practice in Oncology, Toledo VT, Hellman S and Rosenberg SA (edn) JB Lippincot Co: Philadelphia. pp. 1264-1300.
- Hayes DF, Bast R, Desch CE. 1996. A tumor marker utility Trading. *J Natl Cancer* 88:1456-1462.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10):986-994.
- Henninghausen L, Robinson GW. 1998. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes & Dev* 12: 449-455.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 88(16):7276-7280.
- Holland PWH, Holland LZ, Williams NA, Holland ND. 1992. An amphioxus homeobox genes: sequence conservation, spacial expresión Turing development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116:653-61.
- Hortobagyi GN. 1998. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 39:974-984.
- Hu M J Yao, Cai L, Bachean K, van den Brûle F, Velculescu V, Polyak K. 2005. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 37(8):899-905.
- Izon DJ, Rozenfeld S, Fong ST, Komuves L, Largaman C, Lawrence HJ. 1998. Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* 92:383-93.
- Junceda AE. 1988. Cáncer de mama. Editorial Universidad de Oviedo. pp. 276
- Karch F, Weiffenbach B, Pfeifer M, Bender W, Duncan I, Celiniker S, Crosby M, Lewis EB. 1985. The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* 43, 81-96.
- King JA, Ofori-Acquah SF, Stevens T, Mehdi AA, Fodstad O, Jiang WG. 2004. Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R478-R487
- Kirito K, Fox N, Kaushansky K. 2004. Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potencial mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cell. *Mol Cell Biol* 24:6751-62.





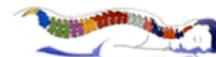
- Knaul FM. 2009. Cáncer de mama: prioridad apremiante. Primer Curso- Taller. El combate al cáncer de mama en México: oportunidades para OPORTUNIDADES. Fundación Mexicana para la Salud. México, DF. Agosto 18, 2009. En www.tomateloapecho.org.mx/Archivos%20web%10TAP/taller%20oport%20WEB/Knaul%20Felicia.pdf. Consultado el 4 de octubre, 2009.
- Knaul F, Bustreo F, Ha E & Langer A. 2009. Cáncer de mama: ¿Por qué integrar la detección temprana con las intervenciones en salud reproductiva en países en vías de desarrollo?. *Salud Pública de México* 2009. Vol. 51 supl. 2:S220-S227.
- Knaul FM, Ornelas AH, Velázquez E, Dorantes J, Méndez O, -Burgos AL. 2009. El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*. Vol. 51. 2:S286-S295.
- Knaul FM, López Carrillo L, Lazcano Ponce E, Gómez Dantés H, Romieu I, Torres G. 2009. Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud Pública de México*. Vol. 51. 2:S135-137.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. 2008. Breast Cancer in Mexico: A Pressing Priority. *Reproductive Health Matters*. Vol. 16. 32:113-123.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*. Vol. 51. 2:S335-S344.
- Knaus JV, Hall JA. 2003. *An atlas of breast disease*. The Parthenon Publishing Group.
- Kufe D, Pollock RE, Weichselbaum RR, Jr Bast RC, TS Gansler, JF Holland, E Frei III, editors. 2003. *Cancer Medicine*. Part II. Scientific Foundation. Section 1. *Cancer Biology*. Editorial BC Decker Inc.
- Kuroiwa A, U Kloter, Baumgartner P, Gehring WJ. 1985. Cloning of the homeotic Sex combs reduced gene in *Drosophila* and in situ localization of its transcripts. *Embo J* 4:3757-64.
- Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res*. 25(18):3718-3723.
- Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis 1 but not Pbx 1. *EMBO J* 17:3714-25.





- Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G. 1997. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid and lymphoid hematopoiesis. *Blood*. 89:1922-30.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 21(16):3761-3766.
- Lester SC, Cotrain RS. 2000. La mama femenina. In: *Patología Estructural y Funcional*. Sexta Edición. Cotrain RS, Kumar V and Collins T (eds). MacGraw-Hill Interamericana: España. pp. 1137-1164.
- Levin M. 2005. MedlinePlus Enciclopedia Médica: Cáncer de Mama. A. D. A. M. Inc. Aczada el 11 de Febrero de 2007. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.htm>
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* *Nature*. 276,565-70.
- Lewis MT. 2000. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res*. 2(3): 158-69.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6):357-362.
- Livingston RB, Esteva RJ. 2001. Chemotherapy and Herceptin for Her-2⁺ metastatic breast cancer: The best drug?. *Oncologist* 6:315-316.
- López L, Torres L. 2001. Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Pública Mexicana*. 43: 199-202.
- Ma XJZ Wang, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Enright, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC. 2004. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*. 5(6): 607-16.
- Mack JA, Anand S, Mytin EV. 2005. Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 75(4):314-29.
- MacMullin RP, Mutton LN, Bieberich CJ. 2009. Hoxb13 regulatory elements mediate transgene expression during prestate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn* 238(3):664-72.





- Makiyama, Hamada KJ, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, Tamoto E, Shido G, Matsunaga A, Teramoto K, Komuro K, Kondo S, Katoh H, Koike T, Moriuchi T. 2005. Aberrant expresión of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep.* 13(4):673-9.
- Martin AM, Barbara L, Weber. 2000. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 92:1126-1135.
- Miller AB, To T, Baines CJ, Wall C. 2000. Canadian National Breast Screening Study-2: 3 Years results of a Randomized Trial in Women Aged 50-59 years. *J Natl Cancer Inst* 92: 1490-1499.
- Molina R, Zanon G, Filella X. 1995. Use of serial carcinoembryonic antigen and CA15.3 assay in detecting relapses in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 36:41-47.
- Muir D, Kanthan R, Kanthan SC. 2003. Male versus female breast cancers. *Arch Pathol Lab Med* 127:36-41.
- Nazarenko I, Lowe B, Darfle M. 2002. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acid Research.* 30:9-37.
- NationMaster. 2004. Disponible en http://www.natiomaster.com/red/graphT/hea_bre_can_inc&int=-1#
- Nilsson E, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation Basic aspects of estrógeno action. *Breast Cancer Res* 2:360-366.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1(3):1559-1582.
- Pardo MGA, Méndez MH, Goethe SB, Leon LAE, Peñaloza VMS, Fernández MRM. 1998. Lactancia Materna. Guía Práctica para su Manejo. Anexo 1. Anatomía y Fisiología de la Glándula Mamaria. Editorial INET Colombiana.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. 2001. Cancer Burden in the year. 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37:S4-S66.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
- Parkin DM, Fernandez LM. 2006. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 12:S70-S80.





- Pericaza C, Diezb O, Camposb B, Balmaña J, Domènechb M, Lermac E, Baenab M, Sabatéd JM, Gómez A, López JJ, Baigetb M, Carmen A. 2001. Características clínico patológicas y evolución clínica de pacientes con cáncer de mama y mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2. *Med Clin (Barc)* 117:161-6.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):45.
- Pilnik S. 2003. *Common Breast Lesions. A photographic guide to diagnosis and treatment.* Cambridge University Press.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. 2002. Estimates of the World-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 1;97(1):72-81.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Fields SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, M Markham AF. 2003. Real-time PCR base don SYBR-Green I fluorescente: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003, 2:18.
- Porter P. 2008. Westernizing women's risk? Breast cancer in lower-income countries. *The New England Journal of Medicine.* Vol. 358: 213-216.
- Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WT, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. 2000. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature.* 405(6789):974-8.
- Rodriguez-S, Macias C, Labastida S. 2000. Cáncer de mama en México ¿Enfermedad de mujeres jóvenes?. *Ginecología y Obstetricia de México.* 68:185-90.
- Rogozin'ska-Szcepka J, Utracka-Hutka B, Gryzbowska E, Maka B, Nowicka E, Smok-Ragankiewicz A, Zientek H, Steffen J, Wojcinechowska-Ła²cka A. 2004. BRCA 1 and BRCA2 mutation as prognostic factors in bilater breast cancer patients. *Ann Oncol* 15: 1373-1376.
- Rosai J. 1989. *Surgical Pathology Seventh Edition.* George Stamathis (ed). CV Mosby Company: Washington DC. pp. 1993-1220.
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagyi GN, Pusztai L. 2003. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. Part II. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4(2):169-88.
- Russo J. 2001. Homeobox genes mediates the biological functions of human Chorionic Gonadotropin (hCG) in human breast epithelial cells. Fox Chase Cancer Center Philadelphia, PA. Final rept. 1 jul 1999-30 Jun 2001. 23 paginas.





- Salazar EL, Garcia M, Avila OA. 1998. Factores de riesgo y su correlación con algunos marcadores tumorales en la incidencia de cáncer mamario en pacientes pre y posmenopáusicos. *Ginec. Obst. Mex.* 66, 263-6.
- Samuel H. Naora. 2005. Homeobox gene expresión in cancer: Insights from developmental regulation and deregulation. *European Journal of Cancer.* 41(16): 2428-37.
- Sayli BS, Akarasu AN, Sayli U, Akhan O, Ceylaner S, Sarfarazi M. 1995. A large Turkish kindred with syndactyly type II (synpolydactyly).1. Field investigation, clinical and pedigree data. *J Med Genet* 32: 421-34.
- Scott MO, Weiner AJ, Hazelrigg TS, Polisky BA, Pirrota V, Scalenghe F, Kaufman TC. 1983. The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell.* 35:763-76.
- Sreenath T, Orosz A, Fujita K, Bieberich CJ. 1999. Androgen-independent expresión of hoxb-13 in the Mouse prostate. *Prostate* 41:203-207.
- Shepherd JCW, McGinnis W, Carrasco AE, DeRobertis EM, Gehring WJ. 1984. Fly and frog homeodomains show homologues with yeast mating type regulatory proteins. *Nature.* 310,70-1.
- Stewart THM, Heppner GH. 1997. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology* 115:141-153.
- Suemori H, Noguchi S. 2000. Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of Mouse embryonic development. *Dev Biol.* 220:333-42.
- Svingen T, Tonissen KF. 2003. Altered HOX gene expresión in human skin and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2(5): 518-23
- Taveau M, Stockholm D, Melissa S. 2002. Quantification of Splice Variants Using Molecular Beacon or Scorpion Primer Analytical Biochemistry 305; 227-235.
- Tyczynski J, Tarkowski W, Parkin DM. 1994. Cancer mortality among Polish migrants to Australia. *Eur J Cancer* 30:478-484.
- United States & Canadian Academy of Pathology. Disponible en:
<http://www.uscap.org/newindex.htm?iap2006/slides04-4.htm>
- Van Dijk MAJ, Hart AAM, Van't Veer LJ. 2000. Differences in estrógen α variant Messenger RNAs between normal human breast tissue and primary breast carcinoma. *Cancer Res* 60:530-533.





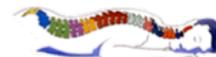
- Volpi A, De Paola F, Granato AM, Bajorki P, Becciolini A, Scarpi E, Riccobon A, Balzi M, Amadori D. 2000. Prognostic significance of biologic markers in node negative breast cancer patients: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat* 63: 181-190.
- Wang BB, Muller-Immergluck M, Austin J, Robinson NT, Chisholm A, Kenyon CA. 1993. Homeotic gene cluster patterns the anteroposterior body axis of *C. elegans*. *Cell* 74, 29-42.
- Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. 2007. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 13(21):6327-34.
- Waters MJ, Conway CBL. 2004. The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer. *PNAS* 101(42):14992-3.
- Webb-Vargas YG. 2007. Expresión diferencial de genes HOX en tumores mamarios del noreste de México. Tesis de licenciatura FCB, Monterrey, N. L., México.
- Wellik DM, Capecchi MR. 2003. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301: 363-7.
- Wittwer CT, Hermann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1):130-131, 134-138.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. 2005. On mammary stem cells. *J Cell Sci* 118:3585-3594.
- Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, McNeese MD, Perkins GH, Schechter NR, Singletary SE, Theriault RL, Hortobagay GN, Hunt KK, Buchholz TA. 2003. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer Staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 21: 3244-3248.
- Wysocka DJ, Aisemberg GO, Baumgarten M, Levine M, Macagno ER. 1989. Characterization of a homologue of bitorax-complex genes in the Leech *Hirudo medicinalis*.
- Yamamoto M, Takai D, Yamamoto FF. 2003. Comprehensive Expression Profiling of Highly Homologous 39 Hox genes in 26 different human Adult tissues by the modified systematic multiplex RT-PCR Method reveals tissue-specific expression pattern that suggests an important role of chromosomal structure in the regulation of Hox gene expression in adult tissues. *Gene Expr* 11(3-4): 199-210.





- Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiera H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H. 2004. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a Sorong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:R24-R30.
- Yañez FL. 2006. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autonoma de Nuevo León.
- Zeltser L, Desplan C, Heintz N. 1996. Hoxb13: a new Hox gene in distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development* 122(8): 2475-84.
- Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. 2003. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a humman mammary epithelial oncogene. *J Bio Chem* 278(9):7580-90.
- Zhao Y, Yamashita T, Ishikawa M. 2005. Regulation of tumor invasión by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncol Rep.* 13(4):721-6.
- Zeichner GI, Candelaria M. 2006. Cancer de mama: Un problema de salud. *Cancerología* 1(3):143-5.





ANEXO

LISTA DE SOLUCIONES

Agua DEPC

1 mL DEPC

1 L Agua MiliQ

Incubar a 37°C durante mínimo 12 horas y esterilizar en autoclave

Agarosa al 1.2%

1.6 g de Agarosa

150 mL de Buffer SB 1X en agua DEPC

Buffer SB 20X

NaOH 0.2 M 8 g de NaOH

H₃BO₄ 0.8 M 51 g de H₃BO₄

Disolver el NaOH en 700 mL de agua destilada, por agitación.

Agregar $\frac{3}{4}$ partes del H₃BO₄ y esperar a que se disuelva. Agregar el resto del H₃BO₄, hasta alcanzar un pH de 8.

Buffer SB 1X

50 mL de Buffer SB 20X

1950 mL de agua destilada o se si es utilizada para trabajar con RNA

Utilizar 1950 mL de agua DEPC.





Etanol 70%

70 mL de Etanol desnaturalizado 96% grado biología molecular
30 mL de agua bidestilada.

Buffer de carga 6X

0.25% Azul de Bromofenol
30% de Glicerol en Agua destilada.

SDS 10X

10 g de SDS
Disolver en 100 mL de agua bidestilada

