

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



“FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA) EN UN GRUPO DE
MUJERES DEL NOROCCIDENTE DE MÉXICO CON CÁNCER DE MAMA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

XOCHITL HELGA CASTRO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. en C. MARÍA CRISTINA MORÁN MOGUEL

ASESOR DE TESIS

Dr. en C. CARLOS BEAS ZÁRATE

GUADALAJARA, JAL., OCTUBRE DE 2005

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

C. Xochitl Helga Castro Martínez
PRESENTE.

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORME opción TESIS con el título: "Frecuencias genotípicas del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en un grupo de mujeres del Noroccidente de México con cáncer de mama", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como directora de dicho trabajo la Dra. María Cristina Morán Moguel, y como Asesor el Dr. Carlos Beaz Zárate.

Sin otro particular, quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
"Piensa y Trabaja"

Las Agujas, Mpio. de Zapopan, Jalisco, september 6, 2004



Dr. Carlos Álvarez Moya
Presidente del Comité de Titulación



Dra. Ana Isabel Ramírez Quintana-Carr
Secretario del Comité de Titulación



COORDINACION DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

CAM/AIRQ/airq

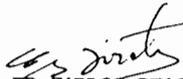
Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

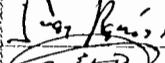
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: "Frecuencias Genotípicas del Polimorfismo I/D del Gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina en un Grupo de Mujeres del Noroccidente de México con Cáncer de Mama" que realizó el/la pasante Xochitl Helga Castro Martínez con número de código B00007099 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Mpio. de Zapopan, Jalisco, 12 de Julio del 2005


 Firma
 Nombre **DRA. MARIA CRISTINA MORAN MOGUEL**
 Directora del trabajo


 Firma
 Nombre **DR. CARLOS BEAS ZARATE**
 Asesor


| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado | Fecha de aprobación |
|--|---|---------------------|
| Dr. Carlos Álvarez Moya |  | 15/Julio/05 |
| Dr. Juan Ramón González García |  | 12-07-2005 |
| M. en C. Ramón Reynoso Orozco |  | 15-julio-05 |
| Supl. Dra. Alma Rosa Villalobos A. |  | 28/06/05 |

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular de la División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco. México.

Alumno:

Xochitl Helga Castro Martínez

Director de Tesis:

D. en C. María Cristina Morán Moguel

Asesor de Tesis:

Dr. en C. Carlos Beas Zárate

Colaboradores:

¹Dr. Angel Emilio Suárez Rincón

¹Dr. Ignacio Arévalo Lagunas

²Dr. José Gonzalo Vázquez Camacho

³QFB. Adriana Patricia Mendizábal Ruiz

³QFB. Susan Andrea Gutiérrez Rubio

¹Hospital de Ginecobstetricia. CMNO. IMSS.

²Unidad de Anatomía Patológica. Hospital de Especialidades. CMNO.IMSS.

³Doctorado en Genética Humana. CUCS. UDG. y División de Medicina Molecular. CIBO. IMSS.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. en C. María Cristina Morán Moguel

Mis padres: Silveria y Jesús

Alfredo.

- porque gracias ustedes esto fue posible -

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Índice de figuras | i |
| Índice de cuadros | ii |
| Abreviaturas | iv |
| | |
| I. Resumen | 1 |
| | |
| II. Introducción | 2 |
| | |
| III. Antecedentes | 4 |
| III.1 Glándulas mamarias | 4 |
| III.1.1 Histología y anatomía | 4 |
| III.2 Historia del cáncer de mama | 4 |
| III.3 Cáncer de mama | 4 |
| III.3.1 Desarrollo tumoral | 5 |
| III.3.2 Metástasis | 5 |
| III.3.3 Cáncer de mama esporádico, familiar y hereditario | 5 |
| III.3.4 Clasificación histológica de los tumores mamarios | 6 |
| III.3.6 El cáncer de mama en México | 10 |
| III.3.5 Mortalidad por cáncer de mama | 10 |
| III.3.6 Morbilidad por cáncer de mama | 11 |
| III.3.7 Factores de riesgo del cáncer de mama | 11 |
| III.3.8 Factores de protección del cáncer de mama | 15 |
| III.4 Angiogénesis en el cáncer de mama | 16 |
| III.5 Vías del factor de crecimiento de la glándula normal y malignizada | 17 |
| III.6 Sistema Renina Angiotensina | 20 |
| III.7 Función del sistema renina angiotensina en la angiogénesis | 21 |
| III.8 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) | 23 |
| III.9 Gen de la ECA | 23 |
| III.10 Polimorfismo I/D del gen de la ECA | 24 |
| III.11 Frecuencias Genotípicas y Alélicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA | 26 |

| | |
|---|-----------|
| IV. Justificación | 28 |
| V. Planteamiento del problema | 29 |
| VI. Hipótesis | 30 |
| VII. Objetivos | 31 |
| VIII. Material y Método | 32 |
| VIII.1 Tipo de estudio | 32 |
| VIII.2 Universo de estudio | 32 |
| VIII.3 Grupos de estudio | 32 |
| VIII.4 Criterios de inclusión | 32 |
| VIII.5 Criterios de exclusión | 33 |
| VIII.6 Tamaño de la muestra | 33 |
| VIII.7 Análisis molecular | 34 |
| VIII.8 Análisis estadístico | 36 |
| IX. Resultados | 37 |
| IX.1 Distribución genotípica y alélica | 37 |
| IX.2 Análisis estadístico | 39 |
| X. Discusión | 41 |
| XI. Conclusiones | 44 |
| XII. Bibliografía | 45 |
| XIII. Apéndice | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Mecanismo de la angiogénesis en el cáncer de mama | 17 |
| 2 | Componentes del Sistema Renina Angiotensina (SRA) | 21 |
| 3 | Función del SRA en la Angiogénesis | 22 |
| 4 | Estructura Bioquímica del SRA | 23 |
| 5 | Gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) | 24 |
| 6 | Método para la detección del polimorfismo I/D del gen de la ECA | 35 |
| 7 | Polimorfismo I/D del gen de la ECA en Gel de poliacrilamida al 6% | 37 |
| 8 | Frecuencia Genotípica del polimorfismo I/D | 39 |
| 9 | Frecuencia Alélica del polimorfismo I/D | 39 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Clasificación histológica de los tumores mamarios | 7 |
| 2 | Clasificación TNM del AJCC y agrupamiento por estadios del cáncer de mama | 9 |
| 3 | Mortalidad por cáncer de mama | 10 |
| 4 | Morbilidad por cáncer de mama | 11 |
| 5 | Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama | 12 |
| 6 | Factores de protección para el desarrollo de cáncer de mama | 15 |
| 7 | Factores de crecimiento de la glándula normal y malignizada | 18 |
| 8 | Polimorfismo I/D del gen de la ECA | 26 |
| 9 | Tipos de muestras para el análisis del polimorfismo I/D del gen de la ECA | 34 |
| 10 | Distribución y frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo I/D de gen de la ECA | 38 |
| 11 | Análisis estadístico χ^2 y Isignificancia para los genotipos del polimorfismo I/D del gen de la ECA | 40 |

| | | |
|----|--|----|
| 12 | Análisis estadístico χ^2 y significancia para los alelos del polimorfismo I/D del gen de la ECA | 40 |
| 13 | Condiciones químicas de amplificación del gen de la ECA | 53 |
| 14 | Condiciones de temperatura y ciclos de amplificación para el polimorfismo I/D del gen de la ECA | 54 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| A | Adenina |
| aa | Aminoácido |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AgNO₃ | Nitrato de plata |
| ADH | Hormona antidiurética o vasopresina |
| AJCC | Comité Conjunto Americano del Cáncer (del inglés American Joint Comite on Cancer) |
| <i>Alu</i> | <i>Arthrobacter luteus</i> |
| BM | Baño María |
| BRCA1 | Breast Cancer 1. Gen de cáncer de mama 1. |
| BRCA2 | Breast Cancer 2. Gen de cáncer de mama 2. |
| C | Citosina |
| Cr | Cromosoma |
| °C | Grados centígrados |
| Conc. | Concentración |
| CTAB | Bromuro de hexadecil trimetil amonio |
| D | Delección |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| dCTP | Desoxicitosina trifosfatada. |
| dGTP | Desoxiguanina trifosfatada. |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfatados |
| DTAB | Bromuro de dodecil trimetil amonio |
| EDTA | Ácido etilén diamino tetra acético |
| FGF | Factor de crecimiento de los fibroblastos |
| g | Gramos |
| HGF/SF | Factor de crecimiento del hepatocito/factor de dispersión |
| I | Inserción |
| I/D | Inserción/Delección |
| IGF-I | Factor de crecimiento tipo insulina-I |
| IGF-II | Factor de crecimiento tipo insulina-II |
| kb | Kilo bases |

| | |
|-------------------|---|
| MDGF-1 | Factor de crecimiento derivado de la mama-1 |
| MDGI | Inhibidor del crecimiento derivado de la mama |
| MEC | Multiétnico de cohorte |
| mg | Miligramos |
| μL | Microlitros |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| nm | Nanómetros |
| N-terminal | Extremo Amino-Terminal |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PA | Presión arterial |
| pb | Pares de bases |
| PDGF | Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas |
| PCR | Reacción en Cadena de Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction) |
| p53 | Gen supresor de tumor p53 |
| RR | Riesgo relativo |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| S | Sangre |
| SS | Secretaría de Salud |
| SRA | Sistema Renina Angiotensina |
| SSAP | Secretaría de salud-programa de acción |
| T | Tejido |
| TEMED | N, N, N',N'-Tetrametil etilén diamina |
| TGFα | Factor de Crecimiento de Transformación alfa |
| TGFβ | Factor de Crecimiento de Transformación beta |
| UICC | Unión Internacional Contra el Cáncer |
| V | Volts |
| VEGF | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular |

I. RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad en la que se produce una proliferación inadecuada e incontrolada de células. Por ser ésta una de las neoplasias más frecuentes en el mundo se ha convertido en un problema de salud pública; a nivel nacional se presenta como el 12avo lugar como causa de muerte en mujeres y en segundo lugar como causa de muerte por tumores malignos; en Jalisco se encuentra en primer lugar con 336 defunciones anuales.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial a la que las mujeres se ven expuestas, por lo que es necesario e indispensable predecir el riesgo de desarrollar esta patología mediante la búsqueda, descripción y análisis de diversos marcadores bioquímicos y moleculares. En el presente trabajo se propone identificar la delección (alelo D) del polimorfismo Inserción/Delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ser un posible marcador genético de riesgo para desarrollar esta patología en mujeres del Noroccidente de México. Los resultados indican que en todos los casos de cáncer de mama se identifica el alelo D (86.73 %) asociado a esta enfermedad, mostrando así que la detección de éste alelo sirve como marcador genético predictivo para el diagnóstico de cáncer de mama al menos en el Noroccidente de México.

II. INTRODUCCIÓN

Una de las mayores esperanzas del estudio de los cambios genéticos que ocurren en el cáncer de mama, es que éste pueda conducir al desarrollo de nuevas estrategias de prevención y detección precoz, tratamientos e instrumentos pronósticos. Sin duda que las mujeres con alto riesgo serán la población en la que más se insistirá en los ensayos de prevención futuros¹.

El cáncer como enfermedad en el mundo se presenta en alrededor de 10 millones de personas al año y aproximadamente 6 millones de muertes ocurren debido a esta patología. Se estima que para el año 2020 habrá más de 15 millones de casos nuevos de cáncer². Sin embargo, cada año se diagnostican alrededor de 570,000 casos de cáncer de mama en todo el mundo, por lo que en las últimas décadas, la incidencia de cáncer mamario en México también ha ido en aumento³. A nivel nacional, el cáncer de mama ocupa el 12^{avo} lugar (3874 defunciones y tasa de 7.4 por cada 100,000 mujeres) como causa de muerte en mujeres⁴. En Jalisco se registra como la primera causa de muerte por tumores malignos en mujeres con 336 defunciones al año por cáncer de mama, con una tasa de 13.0 por cada 100,000 habitantes en el 2003⁴.

La hipertensión durante el embarazo y después de la menopausia ha sido asociada positivamente con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en un número pequeño de estudios. Se ha sugerido una asociación etiológica entre la hipertensión y la incidencia de algunos tipos de cáncer relacionado a hormonas⁵. Por otra parte, también se ha descrito que las mujeres que consumen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) u otros medicamentos antihipertensivos tienen un riesgo menor de presentar cáncer de mama⁶.

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) es uno de los mecanismos humorales de control de la presión sanguínea, volumen de líquido corporal y balance electrolítico que actúa en los primeros tres minutos después de una disminución de la presión arterial (PA), que es un estímulo para la secreción de renina por las células yuxtglomerulares de riñón⁷.

El polimorfismo Inserción/Delección (I/D) del gen de la ECA, que se localiza en el cromosoma 17q23, consiste en la ganancia o pérdida de una secuencia repetitiva *Alu* de aproximadamente 287 pares de bases (pb) en el intrón 16 del gen⁸. El

alelo I de este polimorfismo ha sido asociado con una actividad baja y niveles séricos bajos de ECA circulante, lo que podría reflejarse en una disminución en la síntesis de angiotensina II y por lo tanto en una menor susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de mama⁹, ya que se ha descrito la participación directa de la angiotensina II en la proliferación de células cancerosas, angiogénesis y metástasis¹⁰.

En el presente estudio se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA como marcador de riesgo para desarrollar cáncer de mama en mujeres mexicanas del noroccidente de México.

III. ANTECEDENTES

III.1 GLÁNDULAS MAMARIAS

III.1.1 Histología y Anatomía

La glándula mamaria es un órgano glandular par, ubicado entre abundante grasa y tejido conectivo en la mama¹¹. Las mamas o pechos son órganos encargados de secretar y producir la leche. Existen en ambos sexos y normalmente son dos, un derecho y otro izquierdo, situados en la parte anterior y superior del tórax, por delante de los músculos pectorales. La mama en la mujer descansa sobre el tórax, tiene forma semiesférica y presenta en el centro de su convexidad una papila que es el pezón¹².

III.2 HISTORIA DEL CÁNCER DE MAMA

A pesar de los siglos de devaneos teóricos y búsquedas científicas, el cáncer de mama sigue siendo una de las enfermedades humanas más temidas¹³. Las primeras referencias bibliográficas datan del siglo XIX, cuando el cirujano londinense Sir James Paget (1853) y el médico francés Paul Brocca (1866) efectuaron independientemente un estudio particular del fenómeno tras analizar un número considerable de familias con varios miembros afectados de cáncer de mama. Sin embargo, hasta finales de 1990 se identificó el primer gen de predisposición al cáncer de mama. Posteriormente se siguen descubriendo otros genes relacionados con la predisposición al cáncer de mama, como el gen de la ECA¹⁴.

III.3 CÁNCER DE MAMA

El cáncer es una enfermedad en la que se produce una proliferación inadecuada e incontrolada de células. La pérdida de control del crecimiento celular es el resultado de una serie de cambios genéticos en las células y se origina en un largo proceso de selección y variación. La variación genética es el resultado de la tendencia de las células tumorales a desarrollar procesos de cambios epigenéticos (factor que cambia el fenotipo sin alterar el genotipo), mientras que la selección proviene de las variadas condiciones microambientales a las que se ven sometidas las células durante el crecimiento tumoral¹⁵.

III.3.1 Desarrollo tumoral

El modelo clásico de desarrollo tumoral divide el proceso en tres fases: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual un daño crítico del ácido desoxirribonucleico (ADN) se hace permanente en la célula, debido a que ésta se divide antes de que se repare, o bien por un fallo en el proceso de reparación. La promoción se define como el proceso mediante el cual se cree que determinados sucesos epigenéticos influyen de forma selectiva en la proliferación de las células iniciadas, mientras que la progresión implica la producción de cambios hereditarios más profundos que aparecen a medida que la población celular se divide y se desarrolla el cáncer. El desarrollo tumoral implica una serie de mutaciones o de alteraciones genéticas que se originan sobre todo en células somáticas¹⁵.

La capacidad de las células tumorales para diseminarse y formar metástasis en lugares diferentes al del tumor primario puede considerarse como una de las últimas fases de la progresión tumoral, aunque probablemente continúan produciéndose cambios genéticos en el tumor primario y en sus metástasis a medida que siguen creciendo. Las principales rutas para la diseminación metastásica son los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos, y los vasos sanguíneos hacia lugares más distantes¹⁵.

III.3.2 Metástasis

La metástasis está definida como un crecimiento progresivo de células en un sitio que es discontinuo del tumor primario³⁰. Por definición cada tipo de cáncer descrito hasta la fecha tiene la capacidad de desarrollar metástasis³⁰. Este proceso es altamente ineficiente, ya que solo el 0.1% de las células que se desprenden de un tumor y pasan a la circulación dan lugar a tumores secundarios³¹. El 30% de pacientes con Ca de mama tienen metástasis clínicamente detectable al momento del diagnóstico³⁰.

III.3.3 Cáncer de mama esporádico, familiar y hereditario

- *Cáncer de mama esporádico*. Es un caso de cáncer de mama sin otros antecedentes familiares de carcinoma mamario durante dos generaciones que incluyen hermanos, descendientes, padres, tías, tíos, y ambos conjuntos de abuelos¹³.

- *Cáncer de mama familiar.* Es un caso de cáncer de mama con antecedentes familiares que incluya a uno o más familiares de primero o segundo grado con cáncer de mama y que no se ajuste al cáncer de mama hereditario¹³.
- *Cáncer de mama hereditario (CMH).* El CMH se caracteriza por una edad de inicio significativamente menor (promedio, 45 años), mayor frecuencia de cáncer de mama bilateral, mayor frecuencia de cáncer primario múltiple, como cáncer de mama y de ovario en el síndrome del cáncer de mama/ovario hereditario (CMOH), y patrón de herencia autosómica dominante para la susceptibilidad al cáncer. El CMH debe concordar con estas características clínicas y, por tanto, difiere de las necesarias para el cáncer esporádico¹³.

III.3.4 Clasificación histológica de los tumores mamarios

Los tumores mamarios fueron clasificados por la Organización Mundial de la Salud en seis grupos: tumores epiteliales, tumores mixtos de tejido conectivo y epitelial, otros tumores, tumores no clasificados, displasia mamaria/enfermedad fibroquística y lesiones semejantes a tumores, como se muestra en el cuadro 1¹³.

Clasificación histológica de los tumores mamarios

I. Tumores epiteliales

A. Benignos

1. Papiloma intraductal
2. Adenoma del pezón
3. Adenoma
 - a. Tubular
 - b. Lactosecretor

B. Malignos

1. No invasores
 - a. Carcinoma intraductal
 - b. Carcinoma lobulillar *in situ*
2. Invasor
 - a. Carcinoma ductal invasor
 - b. Carcinoma ductal invasor con componente intraductal predominante
 - c. Carcinoma lobulillar invasor
 - d. Carcinoma mucinoso
 - e. Carcinoma medular
 - f. Carcinoma papilar
 - g. Carcinoma tubular
 - h. Carcinoma quístico adenoideo
 - i. Carcinoma secretor (juvenil)
 - j. Apocrino
 - k. Carcinoma con metaplasia
 - i. Tipo escamoso
 - ii. Tipo de células ahusadas
 - iii. Tipo cartilaginoso y óseo
 - iv. Tipo mixto
- l. Otros
3. Enfermedad de Paget del pezón

II. Tumores mixtos de tejido conectivo y epitelial

- A. Fibroadenoma
- B. Tumor filodo (cistosarcoma filodo)
- C. Carcinosarcoma

III. Otros Tumores

- A. Tumores de tejidos blandos
- B. Tumores de la piel
- C. Tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides

IV. Tumores no clasificados

V. Displasia mamaria/enfermedad fibroquística

VI. Lesiones semejantes a tumores

- A. Ectasia de conducto
- B. Pseudotumores inflamatorios
- C. Hamartoma
- D. Ginecomastía
- E. Otros

Cuadro 1. Clasificación histología de los tumores mamarios (OMS).

El American Joint Comité on Cancer (Comité Conjunto Americano del Cáncer-AJCC) y la Union Internacional Contra el Cáncer (UICC) desarrollaron un sistema TNM para la clasificación y la estadificación clínica o histopatológica del cáncer de mama. Este sistema se basa en la clasificación del tumor (T), ganglios linfáticos (N) y cualquier metástasis a distancia (M). Dicha clasificación se resume en el cuadro 2¹⁶. El sistema TNM incluye el tamaño y la localización de la neoplasia, el grado de invasión local, el estado de los ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis a distancia; además clasifica los tumores por su extensión anatómica mediante asignaciones y luego combina estos grupos en categorías similares desde el punto de vista pronóstico denominadas estadios, los cuales se numeran de 0 a IV en orden decreciente de supervivencia. El estadio 0 es el carcinoma *in situ*, el estadio I es el cáncer localizado, el estadio II designa la diseminación local o regional, el estadio III denota la diseminación local o regional de mayor magnitud y el estadio IV implica la presencia de metástasis a distancia¹³.

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 estos ganglios están adheridos a otras estructuras. La letra M seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes o a ganglios linfáticos no próximos a la mama. La clasificación para los subgrupos, se realiza con números que van del I al IV. Los índices de supervivencia relativa a 5 años, según el estadio del cáncer, son los siguientes: I – 98%, IIA – 88%, IIB – 76%, IIIA – 56%, IIIB – 49% y IV – 16%¹³.

| Clasificación TNM | | Agrupamiento de estadios | | | |
|---|---|--------------------------|-------------|-------------|----|
| Tumor primario (T) | | Estadio | T | N | M |
| TX | El tumor primario no se puede evaluar | Estadio 0 | Tis | N0 | M0 |
| T0 | No hay evidencia de tumor primario | Estadio I | T1 | N0 | M0 |
| Tis | Carcinoma <i>in situ</i> | | T0 | N1 | M0 |
| | | | T1 | N1 | M0 |
| T1 | Tumor < 2 cm en su dimensión mayor | Estadio IIa | T2 | N0 | M0 |
| T2 | Tumor > 2 cm pero < 5 cm | Estadio IIb | T2 | N1 | M0 |
| T3 | Tumor > 5 cm | | T3 | N0 | M0 |
| T4 | Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o a la piel, incluye carcinoma inflamatorio | Estadio IIIa | T0 | N2 | M0 |
| | | | T1 | N2 | M0 |
| | | | T2 | N2 | M0 |
| | | | T3 | N2,3 | M0 |
| Ganglios linfáticos regionales (N) | | | | | |
| NX | Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar | Estadio IIIb | T4 | Cualquier N | M0 |
| N0 | No hay ganglios linfáticos regionales con metástasis | | Cualquier T | N3 | M0 |
| N1 | Metástasis en ganglio (s) linfático (s) axilar (es) móvil (es) | Estadio IV | Cualquier T | Cualquier N | M1 |
| N2 | Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijados a otra u otras estructuras | | | | |
| N3 | Metástasis en ganglios linfáticos de la cadena mamaria interna ipsilaterales | | | | |
| Metástasis a distancia (M) | | | | | |
| Mx | La presencia de metástasis a distancia no se puede evaluar | | | | |
| M0 | No hay metástasis a distancia | | | | |
| M1 | Metástasis a distancia (incluye ganglio (s) supraclavicular (es) ipsilateral(es)) | | | | |

Cuadro 2. Clasificación actual TNM del AJCC y agrupamiento por estadios del cáncer de mama.

III.3.5 El cáncer de mama en México

El cáncer de mama a nivel nacional ocupa el 12^{avo} lugar (3874 defunciones con una tasa de 10.0 por 100,000 habitantes) como causa de muerte en mujeres y el segundo lugar como causa de muerte dentro de todos los tipos de cáncer en mujeres hasta el 2003⁴, sin embargo, según el Registro Estatal de Cáncer de Jalisco, se posiciona al cáncer de mama dentro de todos los tumores malignos, como la principal y primera causa de muerte en mujeres¹⁸, aunque a nivel nacional exista mayor número de defunciones por cáncer cérvico uterino (4,324) que por cáncer de mama (3874)⁴. En Jalisco se registraron 336 defunciones por cáncer de mama con una tasa de 13.0 por 100,000 habitantes en el 2003⁴.

En mujeres, dentro de todos los tipos de cáncer, el de mama sólo es superado por el carcinoma cérvico-uterino a nivel nacional, en algunas entidades de la República incluso ha desplazado al cáncer cérvico-uterino como en Aguascalientes, Baja California Norte y Sur, Coahuila, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, **Jalisco**, Nuevo León, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas, las cuales se caracterizan por tener tasas de hasta 19 defunciones por 100,000 habitantes en mujeres de 25 años o más⁴.

III.3.6 Mortalidad por cáncer de mama

Entre 1922 y 2001 la proporción de muertes por tumores malignos en México paso de 0.6 a 13.1% de las defunciones totales ocurridas por todas las causas y en toda la población. El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país y alrededor de 10 mujeres mueren al día¹⁷ (Cuadro 3).

| Año | Localidad | Grupo | No. de Defunciones en general | No. de Defunciones por Cáncer de Mama |
|------|-----------|------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 2003 | Nacional | En general | 470,692 ¹ | -- |
| 2003 | Nacional | Mujeres | 209,673 ¹ | 3874 ¹ |
| 2003 | Jalisco | En general | 32895 ¹ | -- |
| 2003 | Jalisco | Mujeres | 14,921 ¹ | 336 ¹ |

Cuadro 3. Número de defunciones ocurridas en el año 2003 a nivel nacional y en el Estado de Jalisco debidas a cualquier tipo de enfermedad; número de defunciones debidas al cáncer de mama a nivel nacional y en Jalisco. ¹Mortalidad 2003/SSA.

III.3.7 Morbilidad por cáncer de mama

En México se ha visto el aumento continuo de la incidencia presencia de las enfermedades crónico-degenerativas, hasta constituirse en una de las principales causas de muerte y enfermedad, como se muestra en el cuadro 4¹⁷.

| Año | Localidad | Grupo | Casos Registrados de cáncer en general | No. de Defunciones por Cáncer de Mama |
|------|-----------|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| 2000 | Nacional | Cáncer en general (ambos sexos) | 91,913 ¹ | 10,110 ¹ |
| 2000 | Nacional | Cáncer en Mujeres | 60,663 ¹ | 15,625 ¹ |
| 2003 | Jalisco | Cáncer en general (ambos sexos) | 8,833 ² | 1,261 ² |
| 2003 | Jalisco | Cáncer en mujeres | 3,797 ² | 1,254 ² |

Cuadro 4. Número de casos de cáncer en general a nivel nacional y en el Estado de Jalisco, cáncer en mujeres y número de mujeres con cáncer de mama ¹Compendio de Cáncer/2000, Mortalidad/Morbilidad. ²Registro Estatal del Cáncer 2003/SSA.

III.3.8 Factores de riesgo del cáncer de mama

Algunos autores señalan que el cáncer de mama ocurre con mayor frecuencia en las clases sociales más altas, aunque este hecho podría ser debido a que tienen mayor acceso a los servicios de salud y, por consiguiente, mayor probabilidad de detección¹⁴.

Se han identificado numerosos factores de riesgo que se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama. Éstos pueden agruparse como factores familiares, factores dietéticos, índice de masa corporal, factores hormonales, factores reproductivos, de protección, ambientales y genéticos. Sin embargo, a pesar del reconocimiento de estos factores de riesgo, alrededor del 70 al 80% de las mujeres que desarrollan cáncer de mama no tienen factores de riesgo identificables¹⁷. Todos los factores de riesgo antes mencionados se describen a detalle en el cuadro 5.

FACTOR DE RIESGO**DESCRIPCIÓN****Género.-**

* Femenino >> masculino¹⁵.

Dietéticos.-

* Obesidad (mujeres menopáusicas). La relación entre el peso y el riesgo de cáncer de mama depende de forma crítica de la edad. Entre las mujeres postmenopáusicas, un incremento de 10 kg de peso resulta en un incremento aproximado del 80% de riesgo de cáncer de mama¹.

* El consumo aumentado de grasas durante la infancia o la adolescencia aumenta el riesgo de cáncer de mama¹⁴.

Índice de masa corporal.-

* Mujeres que son consideradas con alto riesgo de cáncer de mama, presentan índices de masa corporal elevados¹⁴.

Hormonales.-

* Estrógenos posmenopáusicos. La exposición mediante el uso de hormonas exógenas después de la menopausia provoca un aumento en el riesgo de cáncer de mama en mujeres de edad avanzada. Tanto los estrógenos solos, los estrógenos más progesterona y la progesterona sola aumentan el riesgo de cáncer de mama¹³.

Familiares.-

* Las mujeres con familiares de primer grado (madre, hermana, hija) afectadas tienen un riesgo de dos a tres veces superior al de la población general¹⁴.

Enfermedad benigna de la mama.-

* Las lesiones benignas de la mama se clasifican como proliferativas o no proliferativas. La enfermedad no proliferativa no se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama mientras que la proliferativa si atipias provoca un pequeño aumento del riesgo (riesgo relativo, 1.5 a 2)¹.

Reproductivos.-

* Edad avanzada en el primer parto. Las mujeres que tienen un embarazo tardío completo están en mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres nulíparas¹; si se produce después de los 30 años habrá altos niveles de estradiol, incremento de la prolactina, alteración de la

fisiología mamaria y la alteración de la respuesta de la mama al efecto carcinógeno de las hormonas¹⁷.

* Los abortos tanto espontáneos como inducidos, ocurridos antes del primer embarazo, están asociados con alto riesgo de cáncer de mama¹.

* Nuliparidad. Las mujeres después de los 40 años de edad que son nulíparas presentan mayor riesgo de cáncer de mama¹⁴.

* Las mujeres con menarquia precoz, de 12 años de edad o más jóvenes, y establecimiento rápido de ciclos regulares cuadruplicaban el riesgo de cáncer de mama comparadas con mujeres con menarquia tardía, de 13 años de edad o mayores y mayor duración de ciclos irregulares. La menarquia precoz y la ovulación regular equivalen a una acumulación del número de ciclos ovulatorios (exposición acumulada de estrógenos y progesterona) es un determinante mayor para el cáncer de mama¹.

* Menopausia. La aparición tardía de la menopausia y la intensa exposición a ciclos ovulatorios al final de la vida menstrual incrementa el riesgo de cáncer de mama. Mujeres cuya menopausia natural aparece antes de los 45 años tienen solo la mitad de riesgo de cáncer de mama que aquellas cuya menopausia sucede después de los 55 años. El 75% de los cánceres de mama se producen en mujeres posmenopáusicas¹.

* Uso de anticonceptivos orales a edades tempranas. El uso prolongado comenzando a una edad temprana puede producir un aumento en el riesgo para las mujeres jóvenes¹³.

* Tratamiento sustitutivo hormonal posmenopáusico. La administración de estrógenos sin progesterona para el alivio de los síntomas menopáusicos¹⁵.

Ambientales.-

* Exposición a radiación ionizante¹⁴.

Genéticos.-

* Existen evidencias de familias que presentan deleciones o pérdidas de alelos en determinadas regiones de ciertos cromosomas, esta situación da como resultado un mayor riesgo de padecer ciertos cánceres¹⁴. Algunos de los genes implicados como factores de riesgo del cáncer de mama son: el BRCA¹, BRCA², p53, ECA¹⁴.

Tabaquismo.-

* El consumo de más de una cajetilla por día¹⁷.

Ingesta de alcohol frecuente.-

* El elevado consumo de alcohol se relaciona con un incremento del riesgo de cáncer de mama¹⁷.

Sedentarismo acentuado

Cuadro 5. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama.

III.3.9 Factores de protección del cáncer de mama

Existen ciertos factores que minimizan y protegen el riesgo a desarrollar cáncer de mama, los cuales se describen a detalle en el cuadro 6.

| FACTOR | DESCRIPCIÓN |
|-----------------------------|---|
| Maternidad temprana | La edad de la madre en el primer embarazo reduce el riesgo de cáncer de mama, y cuanto más joven sea la mujer en el primer parto, menor el riesgo (antes de los 20 años, en cambio las mujeres que tuvieron el primer parto después de los 20 años presentan un 40-50% más de riesgo que las que tuvieron el primer parto antes de esa edad) que en mujeres nulíparas ^{1, 14} . |
| Multiparidad | El riesgo de cáncer de mama disminuye un 40% al aumentar la paridad superior o igual a cuatro nacimientos ¹⁴ . |
| Lactancia temprana | La duración de la lactancia en el primer nacimiento vivo, se asocia con una reducción del riesgo de cáncer de mama (RR=0.72) ¹³ . |
| Edad tardía de la menarquia | Existe un descenso de un 20% de riesgo a padecer cáncer de mama con cada año de retraso ¹ . |
| Actividad física | La actividad física intensa puede retrasar la menarquia; en la adolescencia y edad adulta reduce significativamente el riesgo de cáncer de mama en mujeres jóvenes (40 años de edad o menores). El riesgo de cáncer de mama entre las mujeres con cuatro o más horas de actividad física durante el periodo reproductivo es de un 60% inferior que el de las mujeres inactivas ¹ . |

Cuadro 6. Factores que protegen el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

III.4 ANGIOGÉNESIS EN EL CÁNCER DE MAMA

La angiogénesis, o neovascularización es el proceso responsable de la formación de nuevos vasos sanguíneos y tiene lugar en neoplasias benignas y malignas¹³.

En la década de los 1970s, antes del descubrimiento de las proteínas angiogénicas, se demostró la presencia de mayor actividad angiogénica en tejidos mamarios que progresaron desde un estadio preneoplásico hacia un estadio neoplásico¹³. En los tumores la neovascularización generalmente se desarrolla antes de la invasión tumoral.

El crecimiento y la diseminación del cáncer dependen de la angiogénesis, porque sólo pequeñas poblaciones de células pueden sobrevivir sin su propia irrigación sanguínea y los tumores no podrían crecer más que unos pocos milímetros cúbicos y el cáncer no adquiriría importancia clínica¹³. A medida que se induce la formación de nuevos capilares a partir de los capilares y las vénulas preexistentes, tiene lugar el crecimiento de células tumorales alrededor de estos vasos neoformados. Un tubo capilar único puede estar rodeado de hasta tres, cuatro o más capas concéntricas de células tumorales. La replicación de nuevos capilares, cada uno de ellos como sustento de células tumorales, permite la expansión rápida de la masa tumoral. Un segmento de tubo capilar formado por una sola célula endotelial es capaz de nutrir de cinco a cincuenta células tumorales¹³.

El proceso de neovascularización da por resultado la formación de capilares con membranas basales incompletas que permiten el "escape" de distintos elementos. Ésto les proporciona a las células tumorales un acceso fácil a la circulación para emigrar y formar metástasis¹³. La estimulación del crecimiento tumoral después del comienzo de la neovascularización se atribuye a la perfusión de las células tumorales por un nuevo aporte de sangre que permite la oferta de oxígeno y nutrientes y la eliminación de los catabolitos¹³ (Figura 1).

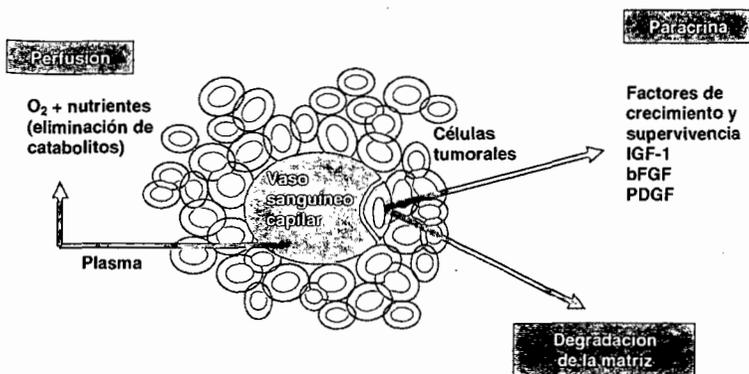


Figura 1. Estimulación parácrina de las células tumorales por factores de crecimiento [Factor de Crecimiento Parecido a Insulina-1 (IGF-1), Factor de Crecimiento Fibroblástico Fundamental (bFGF) y el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)] y supervivencia de las células endoteliales. La neovascularización de un tumor posibilita el aporte de oxígeno y nutrientes a las células tumorales y la eliminación de los catabolitos.

III.5 VÍAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EN LA GLÁNDULA NORMAL Y MALIGNIZADA

Los productos secretores naturales de las células epiteliales mamarias, calostro y leche son fuentes abundantes de factores de crecimiento, los cuales probablemente tienen varios fines en el crecimiento de la mama y la carcinogénesis mamaria¹.

Los factores de crecimiento mejor conocidos son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los factores de las familias: **EGF**, **FGF** y **TGFβ**¹ (Cuadro 7). Estrógenos, antiestrógenos, progestinas y antiprogestinas regulan con gran potencia determinados factores de crecimiento de las familias EGF, TGFβ y proteínas de fijación secretadas para la familia del IGF¹.

-
- FAMILIA** **Factor de crecimiento epidérmico (EGF).**
Regulador importante de la proliferación y la diferenciación de la glándula mamaria. El EGF circulante puede potenciar la formación espontánea de tumores mamarios en el modelo de ratón y también el crecimiento de los tumores una vez formados. La hiperexpresión de los miembros del EGF contribuye a la progresión del cáncer.
- FACTORES DE CRECIMIENTO** TGF α , el nivel de secreción de TGF α en el cáncer de mama esta relacionado con la expresión de oncogenes.
- FAMILIA** **Factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF)**
Implicada en el crecimiento de la glándula mamaria y en su transformación maligna.
- FACTORES DE CRECIMIENTO** FGF-1, en el cáncer de mama humano contribuyen a la inflamación y la angiogénesis.
FGF-1, FGF-2, FGF-7, se han detectado en preneoplasias, tumores y líneas celulares mamarias.
FGF-3, factor de crecimiento oncogénico activado en la glándula mamaria de ratón por mutagénesis.
FGF-4, asociado a la presencia de metástasis en tumores mamarios de ratón.
FGF-3 y FGF-4, se ha observado la amplificación de los genes que los codifican en el cáncer de mama humano. Se han localizado receptores de FGF-1 a 4 en células de cáncer de mama humano.
- FAMILIA** **Factor de crecimiento de transformación β (TGF β)**
Presente en el epitelio mamario maligno y normal y en la leche humana. Es negativo en sus efectos proliferativos en el epitelio ductal en las glándulas mamarias de ratón.
-

La producción de TGF β aumenta a medida que lo hace la progresión maligna en el cáncer de mama: su acumulación tiene importancia para el desarrollo del estroma desmoplásico fibroso característico de la enfermedad, para la angiogénesis tumoral y para la supresión inmunitaria. En líneas celulares *in vitro* puede estimular la invasión de células tumorales.

**FACTORES DE
CRECIMIENTO**

TGF β_1 , TGF β_2 , TGF β_3 .

**OTROS
FACTORES**

La prolactina, el factor de crecimiento procedente de la mama-1 (MDGF-1) y el factor de crecimiento tipo insulina-II (IGF-II), son factores autócrinos positivos en el cáncer de mama.

El factor inhibidor del crecimiento procedente de la mama (MDGI) y la mamostina, tienen funciones negativas de crecimiento para el cáncer de mama.

El factor de crecimiento del hepatocito/factor de dispersión (HGF/SF), el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) y el IGF-II son estimuladores epiteliales paracrinos.

El HGF/SF, la pleiotropina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), sirven como factores angiogénicos e inductores de la vascularización en la enfermedad.

Cuadro 7. Factores de crecimiento de la glándula mamaria normal y malignizada.

Éstos factores de crecimiento influyen sobre la glándula mamaria, algunos de éstos activados gracias a la angiotensina II originada en el sistema renina angiotensina dando paso a la formación de la angiogénesis como se describe a continuación.

III.6 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Las células musculares lisas modificadas de las arteriolas aferente y eferente del glomérulo son el lugar de síntesis, almacenamiento y liberación de renina. La **renina**, por sí sola, no posee una función fisiológica: sólo actúa como enzima proteolítica. Su sustrato es una proteína circulante, el **angiotensinógeno** producido por el hígado. El angiotensinógeno es hidrolizado por la renina para producir un péptido de diez aminoácidos (aa), la **angiotensina I**. La angiotensina I tampoco posee una función fisiológica conocida y es hidrolizada a un péptido de ocho aa, la **angiotensina II**, por una enzima convertidora (enzima convertidora de angiotensina) que se encuentra en la superficie de las células epiteliales. Las células endoteliales pulmonares son el principal lugar de conversión de angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II posee varias funciones fisiológicas importantes como:

- 1) estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal,
- 2) vasoconstricción arteriolar, lo que aumenta la presión arterial,
- 3) estimulación de la secreción de la hormona antidiurética o vasopresina (ADH) y de la sed y
- 4) aumento de la reabsorción de NaCl por el túbulo proximal.

La angiotensina II ejerce su función a través de dos receptores descritos hasta la fecha y denominados receptores de angiotensina II tipos 1 y 2 respectivamente (AT1R y AT2R); del AT1R existen dos subtipos: a y b⁷ (Figura 2).

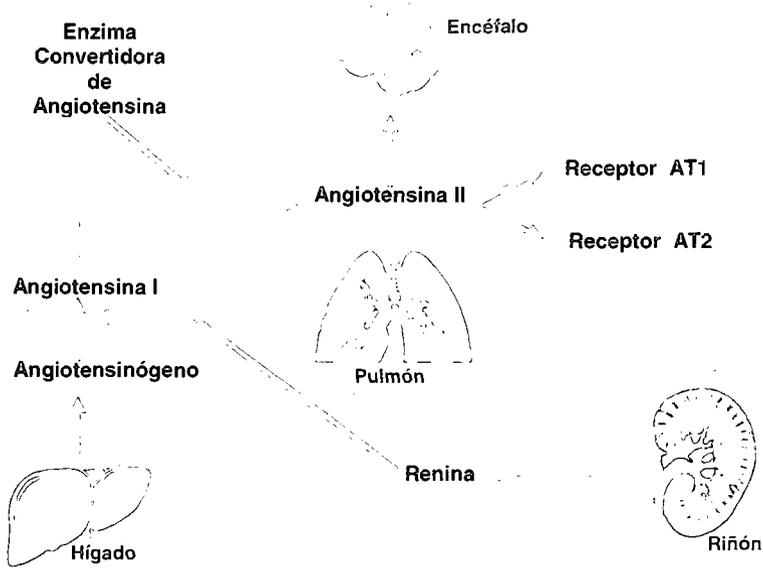


Figura 2. Componentes fundamentales del Sistema Renina Angiotensina.

III.7 FUNCIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA ANGIOGÉNESIS

Uno de los mejores factores angiogénicos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Muchos reportes han indicado que el VEGF activa la formación de nuevos vasos en muchos tipos de tejidos. La hipoxia en el tejido es un fuerte estímulo de la expresión del VEGF. La hipoxia induce la expresión del factor de transcripción inducible de hipoxia-1 (HIF-1), este factor es una proteína compuesta por dos subunidades: HIF-1 α y HIF-1 β . En una situación de normoxia (nivel normal de oxígeno), la subunidad HIF-1 α se degrada por hidroxilación y es destruida, mientras que cuando se encuentra en una situación de falta de oxígeno como es el caso de la hipoxia, la HIF-1 α no se degrada, sino que se une a la HIF-1 β dando lugar al factor HIF-1 y es cuando actúa como regulador principal en la activación, estimulación y expresión de los diferentes genes regulados por el oxígeno²².

También se ha descrito que la angiotensina II induce la expresión del VEGF en células endoteliales y vasculares del músculo liso bajo condiciones no hipóxicas, esto es causado por la inducción del HIF-1 α por medio del receptor AT1 de la angiotensina II. La angiotensina II aumenta la expresión del gen de HIF-1 α por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. La proteína quinasa C está involucrada en la activación del gen del HIF-1 α , mientras que la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa es importante para la estabilización del ARNm del HIF-1 α ²². El mecanismo de la función del Sistema Renina Angiotensina sobre la angiogénesis es representado en el diagrama de la Figura 3.

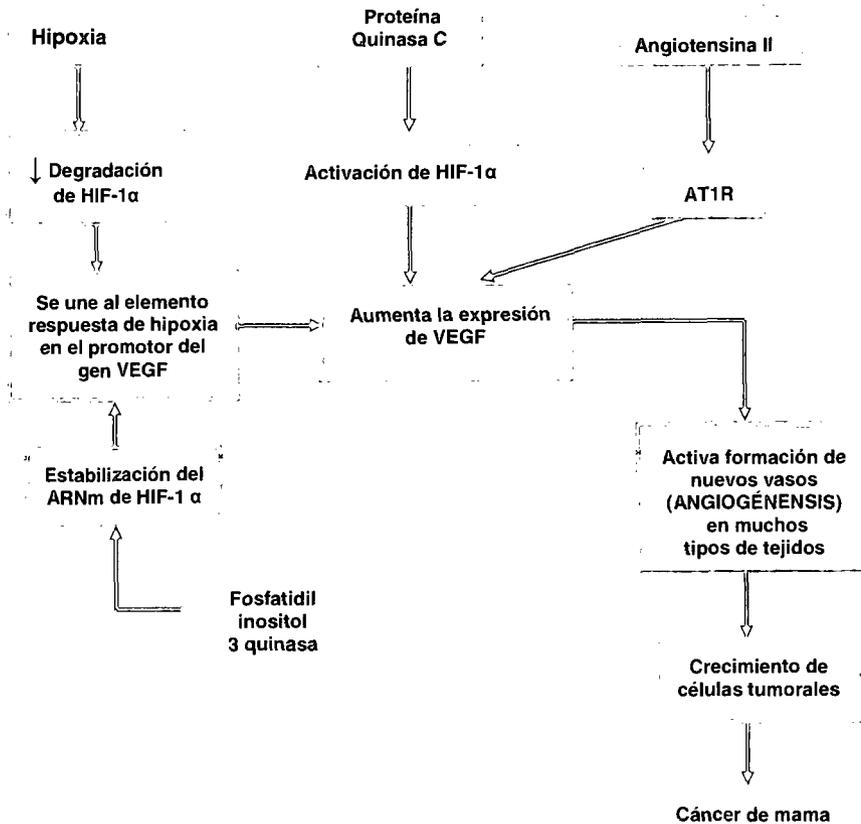


Figura 3. Función del Sistema Renina Angiotensina en la angiogénesis.

III.8 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina es una dipeptidil-carboxipeptidasa que desdobla a la histidil-leucina de la angiotensina I (fisiológicamente inactiva), formando el octapéptido angiotensina II (Figura 4). La mayor parte de la ECA que forma angiotensina II en la circulación está situada en las células endoteliales. Gran parte de la conversión se produce al pasar la sangre a través de los pulmones, pero también hay conversión en muchas otras partes del cuerpo¹⁹. La ECA es una enzima que existe en dos formas: una forma somática que se encuentra en toda la extensión del cuerpo y una forma germinal que está únicamente en las células espermáticas en maduración¹⁹.

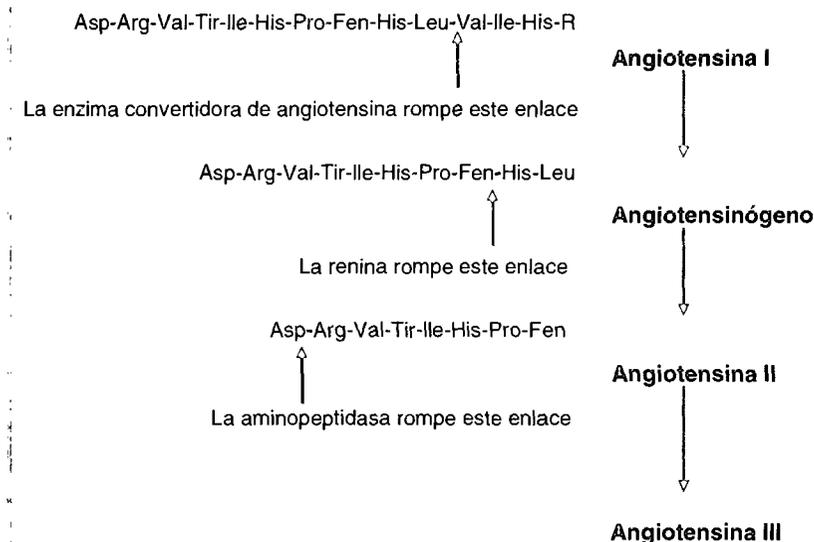


Figura 4. Estructura del extremo Amino-terminal del angiotensinógeno y de las angiotensinas I, II y III en humano. R, resto de la proteína¹⁹.

III.9 GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

El gen de la ECA se localiza en el cromosoma 17q23, el cual se extiende en 21 kilobases (kb), comprende 26 exones y 25 intrones^{20,28}, cuyo tamaño va desde 88 a 481 pares de bases²⁰, contiene dos ARNm: un ARNm endotelial (4.3 kb) que transcribe para el exón uno al exón 26, excepto el exón 13 y un ARNm testicular de 3 kb el cual transcribe para el exón 13 al exón 26 (Figura 5).

III.10 POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ECA

El principal polimorfismo descrito en el gen de la ECA es una Inserción/Delección (I/D) en el intrón 16 del gen. El polimorfismo consiste en la pérdida o ganancia de una secuencia repetitiva *Alu* de aproximadamente 287 pares de bases (pb). La presencia o ausencia de la delección da lugar a tres genotipos: DD, ID e II^{8,20} (Figura 5).

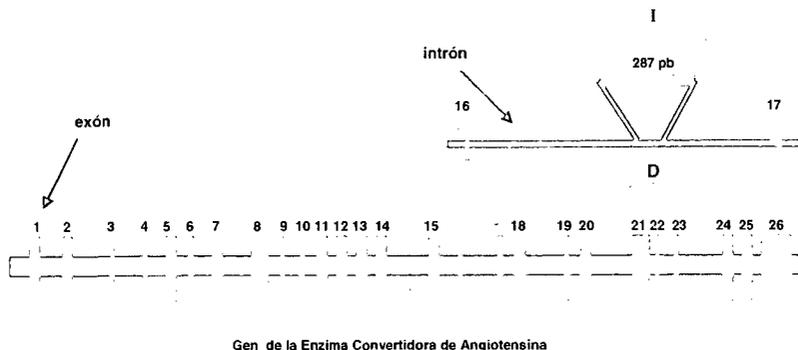


Figura 5. En la parte inferior de la figura se representa la estructura del gen ECA. Los 26 exones están representados por barras verticales. La parte central de la figura es una ampliación del intrón 16, donde se encuentra localizado el polimorfismo I/D del gen de la ECA, con la inserción del fragmento *Alu* de 287 pares de bases (bp).

Haiman y cols. (2003) en un estudio multiétnico de cohorte (MEC), evaluaron la relación entre el polimorfismo I/D y el riesgo de cáncer de mama en un análisis de casos y controles por medio de PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) con mujeres Afro-Americanas, Japonesas, Latinas y blancas. Las mujeres que presentaron el genotipo I/I mostraron un incremento significativo para el riesgo de desarrollar cáncer de mama comparado con las mujeres que presentaron el genotipo D/D. Sin embargo, esta asociación no fue consistente en todos los grupos étnicos por la variación en la frecuencia para el alelo I del polimorfismo I/D, en donde la prevalencia fue de 40%, 46%, 52%, y 66% para las Afro-Americanas, blancas, Latinas y Japonesas, respectivamente. Por lo que estos resultados proponen que el polimorfismo I/D del gen de la ECA no es un buen indicador pronóstico del riesgo de cáncer de mama⁹.

Por otra parte con base en esta evidencia, **Koh y cols.** (2003) evaluaron el polimorfismo I/D del gen ECA por medio de PCR en un estudio de casos y controles en mujeres Chinas de Singapore y encontraron que las mujeres que presentaron el alelo I en su genotipo (I/I o I/D) tienen menos riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres con el genotipo D/D²¹. Estos estudios se comparan en el cuadro 8, en el se presenta el genotipo I/D con mayor frecuencia para los diferentes grupos (casos, controles y población general) y autores. Ambos alelos (I y D) muestran igual proporción en ambos estudios.

Frecuencias Genotípicas y Alélicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA

| Grupo | N | Genotipo | | | Alelo | | Población | Autor |
|------------|-----|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|
| | | I/I | I/D | D/D | I | D | | |
| Casos | 182 | 79 43.4% | 80 44% | 23 12.6% | 238 65.4% | 126 34.6% | Chinas de Singapore | W. P. Koh y cols ²¹ |
| Controles | 643 | 282 43.9% | 305 47.4% | 56 8.7% | 869 67.6% | 417 32.4% | | |
| P. Gral. | 808 | 354 43.4% | 376 46.5% | 78 9.7% | 1084 67.8% | 532 32.2% | | |
| *Casos | 124 | 59 47.6% | 46 37.1% | 19 15.3% | 164 66.1% | 84 33.9% | | |
| *Controles | 464 | 39 44.2% | 220 47.4% | 205 8.4% | 298 32.1% | 630 67.9% | | |
| Casos | 257 | 62 24.1% | 118 45.6% | 77 30% | 242 47.8% | 272 52.2% | Afroamericanas | C. A. Haiman y cols ⁹ |
| Controles | 631 | 100 15.8% | 310 49.1% | 221 35.1% | 510 40.4% | 752 59.6% | | |
| Casos | 284 | 119 41.9% | 128 45.7% | 37 13.7% | 366 64.4% | 202 35.6% | Japonesas | |
| Controles | 357 | 154 43.1% | 160 44.8% | 43 12.1% | 468 65.5% | 246 34.5% | | |
| Casos | 249 | 73 29.3% | 127 51% | 49 19.7% | 273 54.9% | 225 45.1% | Latinas | |
| Controles | 652 | 189 29% | 301 46.2% | 162 24.9% | 679 52.8% | 625 47.2% | | |
| Casos | 292 | 79 27.1% | 129 44.1% | 84 28.8% | 287 49.1% | 297 50.1% | Blancas | |
| Controles | 402 | 91 22.6% | 187 46.5% | 124 30.9% | 369 46% | 435 54% | | |

Cuadro 8. Polimorfismo I/D del gen de la ECA entre autores. *Koh y cols., grupo de casos con exclusión de individuos con hipertensión, enfermedad coronaria o diabetes.

Aunque los resultados de estos estudios son discrepantes, la descripción de nuevos datos apoyan la participación directa de la angiotensina II en la proliferación de células cancerosas, angiogénesis y metástasis, procesos implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama⁹.

La neovascularización es indispensable para el crecimiento y metástasis de los tumores cancerosos, así estos tumores dependen de la angiogénesis²⁹. Fujita y cols. describen que la angiotensina II estimula angiogénesis *in vivo* en modelos de esponjas, así mismo la actividad angiogénica de la angiotensina II en este modelo fue bloqueada con antagonistas del receptor AT1, el cual inhibe ambos receptores AT1a y AT1b¹⁰. Con base en ésto Lever y cols. en un estudio retrospectivo de cohorte de 10 años continuos con 5207 pacientes que recibieron inhibidores de la ECA u otros antihipertensivos relacionados con la inhibición de la ECA disminuyeron la incidencia de desarrollar tumores malignos⁶, por lo que los efectos de los inhibidores de la ECA en tumores son altamente dependientes de la reducción de la angiotensina II¹⁰.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama a nivel nacional ocupa el 12avo lugar (3874 defunciones con una tasa de 10.0 por 100,000 habitantes) como causa de muerte en mujeres y el segundo lugar como causa de muerte dentro de todos los tipos de cáncer en mujeres hasta el 2003⁴.

Por la magnitud de este problema de salud pública, es necesario predecir el riesgo de desarrollar esta patología mediante la búsqueda, descripción y análisis de diversos marcadores bioquímicos y moleculares.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se desconocen las frecuencias genotípicas del polimorfismo I/D del gen ECA en mujeres del Noroccidente de México con cáncer de mama y si el alelo D puede ser un marcador genético de riesgo o predictivo para desarrollar esta patología en mujeres del Noroccidente de México. Determinar esta característica molecular permitirá tener una herramienta más práctica y factible para analizar y diagnosticar el cáncer de mama.

VI. HIPÓTESIS

El alelo D del polimorfismo I/D del gen ECA se asocia con un mayor riesgo para desarrollar cáncer de mama en un grupo de mujeres mexicanas del Noroccidente de México.

VII. OBJETIVOS

General.-

Detectar el genotipo I/D del gen ECA por PCR en un grupo de mujeres mexicanas del Noroccidente de México con y sin cáncer de mama y analizar la asociación del alelo D con el riesgo para desarrollar esta patología.

Particulares.-

- 1) Detectar el genotipo I/D del gen ECA en un grupo de mujeres mexicanas del Noroccidente de México con y sin cáncer de mama.
- 3) Calcular las frecuencias genotípicas del polimorfismo I/D del gen ECA en ambos grupos estudiados con y sin cáncer de mama.
- 4) Calcular las frecuencias alélicas del polimorfismo I/D del gen ECA en ambos grupos estudiados con y sin cáncer de mama.
- 5) Analizar si existe asociación del alelo D con el riesgo para desarrollar cáncer de mama en un grupo de mujeres mexicanas del Noroccidente de México.



VIII. MATERIAL Y MÉTODO

VIII.1 Tipo de estudio

Retrospectivo, descriptivo y de casos y controles

VIII.2 Universo de estudio

Individuos mexicanos, derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social que fueron captados en los Hospitales de Ginecobstetricia y Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente (C.M.N.O) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Guadalajara, Jalisco.

VIII.3 Grupos de estudio

Casos:

- Individuos con cáncer de mama

Controles:

- Individuos sin cáncer de mama

Población General:

- Individuos voluntarios

VIII.4 Criterios de inclusión.

Casos:

- Biopsias de mama incluida en parafina de mujeres que se haya confirmado el diagnóstico histopatológico de cáncer de mama.

Controles:

- Biopsias de mama incluida en parafina de mujeres en los que se haya descartado los procesos neoplásicos malignos al someterse al análisis histopatológico.

Población General:

- Muestra de sangre completa de un grupo de individuos voluntarios (hombres y mujeres) que acudieron a los Hospitales de Ginecobstetricia y Especialidades del C.M.N.O. del I.M.S.S. en Guadalajara, Jalisco.

VIII.5 Criterios de exclusión.

Casos:

- Biopsias de pacientes que recibieron previamente radioterapia.
- Biopsias de pacientes que recibieron previamente quimioterapia

Controles:

- Biopsias de pacientes con antecedente personal de algún tipo de neoplasia.
- Biopsias de pacientes con antecedente familiar de neoplasia.
- Duplicado de biopsias del mismo paciente.

Casos, Controles y Población General:

- Muestras cuya calidad, cantidad y pureza de ADN fueron insuficientes para realizar el proceso de amplificación por PCR.
- Muestras que se dañaron involuntariamente en alguno de los procesos.

VIII.6 Tamaño de la muestra

Todas las biopsias de mamas de la genoteca (114 muestras) del laboratorio de Oncología de la División de Medicina Molecular del C.I.B.O. fueron analizadas, las cuales se captaron en el período de Junio del 2000 a Septiembre del 2002 en los Hospitales de Ginecología y Especialidades del C.M.N.O. del I.M.S.S. Se incluyó un grupo de muestras de sangre venosa de individuos mexicanos, donadores de sangre que acudieron al Banco de Sangre de Especialidades del C.M.N.O. cuya participación fue voluntaria.

Todas las muestras de la población de estudio: casos, controles, y población general (Cuadro 9), fueron analizadas mediante los siguientes procesos: Extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación mediante PCR de un fragmento de 490 pb del intrón 16 del gen de la ECA, electroforesis en poliacrilamida al 6% y tinción con nitrato de plata (Figura 6).

| Grupo analizado | Tipo de muestra | Tamaño de muestra |
|-------------------|--|---------------------------|
| Casos | Biopsias de mama incluidas en parafina | 49 |
| Controles | Biopsias de mama incluidas en parafina | 37 |
| Población General | Sangre periférica | 28 |
| | | Total 114 muestras |

Cuadro 9. Número y tipos de muestra analizados.

VIII.7 Análisis molecular

El método para la detección del genotipo I/D en el gen de la ECA fue descrito por Rigat y cols²³. (1992). Éste se basa en la amplificación de un fragmento del intrón 16 del gen de la ECA del cromosoma 17, en la banda q23 mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Si está presente la inserción de la secuencia *Alu* de 287 pb, el producto amplificado será de 490 pb. Si está presente la deleción ésta corresponderá a un fragmento de 190 pb^{6,20,23}. El procedimiento completo se muestra en la Figura 6.

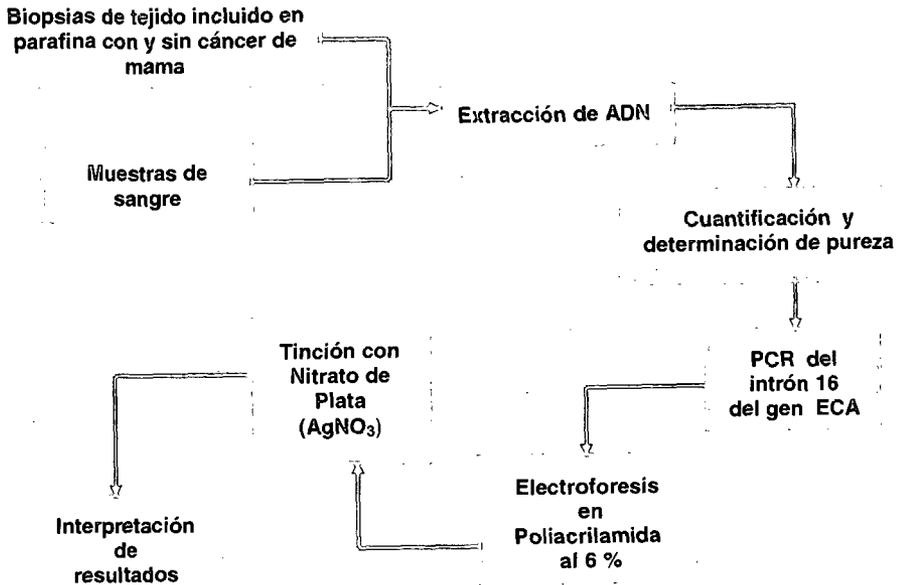


Figura 6. Metodología para la detección del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

Todas las condiciones de extracción de ADN, amplificación por PCR y electroforesis en poliacrilamida al 6% fueron estandarizadas y se encuentran a detalle en el apéndice.

Extracción de ADN.

- **Muestras de Sangre.**- La sangre venosa (5mL) se colectó en tubos con EDTA como anticoagulante y la extracción de ADN se realizó de acuerdo al método descrito por Gustrinnich y cols²⁵.
- **Muestra de tejido incluido en parafina.**- las biopsias de tejido incluido en parafina fueron procesadas de acuerdo al método descrito Wright y Manos²⁴.

Cuantificación de ADN.

Se han descrito diversos métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos. El más utilizado es el método espectrofotométrico en el cual se determina la densidad óptica (DO) a 260 nanómetros (nm) que permite el cálculo de la concentración de ADN en solución. Una DO de 1 a 260 nm corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de doble cadena. La tasa entre las lecturas a 260nm y 280nm (DO_{260}/DO_{280}) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico con respecto a las proteínas²⁵.

Amplificación por PCR.

Mediante PCR se amplificó la región del intrón 16 del gen de la ECA donde se localiza el polimorfismo I/D con el uso de iniciadores específicos previamente descritos por Rigat y cols²³. Las condiciones de reacción y ciclos de PCR se describen en el apéndice.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida es el más utilizado para analizar productos amplificados. Se prepara a partir de una solución al 30 % (29 g de acrilamida y 1 g de N-N'-metilbisacrilamida) que debe permanecer en un envase oscuro a temperatura ambiente²⁶.

Tinción con nitrato de plata (AgNO_3).

Esta tinción proporciona una mayor nitidez y resolución, que facilita a su vez la interpretación de resultados²⁷. El método para ésta tinción se describe en el apéndice.

VIII.8 Análisis estadístico

Por medio de conteo génico se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA en los grupos de casos de mama, controles y población general. La comparación entre las frecuencias genotípicas y alélicas de estos grupos se analizaron por χ^2 .

IX. RESULTADOS

Se detectó el polimorfismo I/D del gen de la ECA mediante el análisis de los productos amplificados por PCR en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con AgNO_3 (Figura 7).

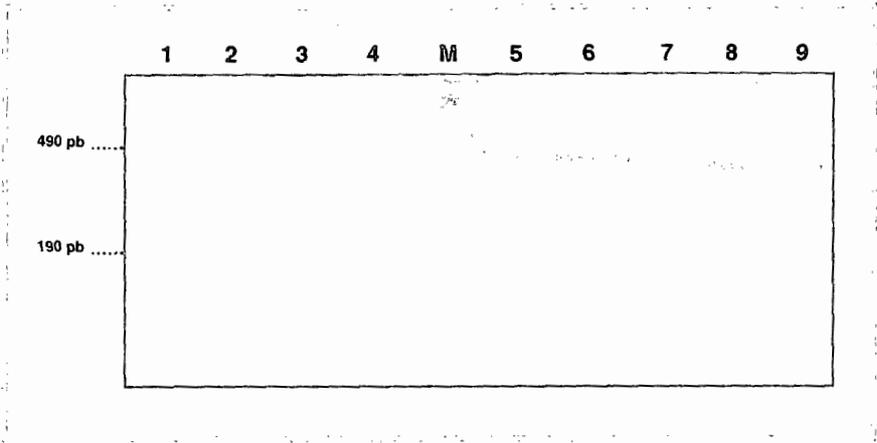


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con AgNO_3 . Carriles 1,2,6,7 y 9 heterocigotos I/D (inserción/delección) con una banda de 490 y una de 190 pb. Carriles 3 y 4 homocigotos D/D. Carriles 5 y 8 homocigotos I/I. M= Marcador de peso molecular escalera de 100 pb.

IX.1 Distribución genotípica y alélica

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para el polimorfismo I/D del gen de la ECA se presentan a continuación:

En el grupo de **casos** de cáncer de mama (de 49 individuos) se encontraron cuatro individuos homocigotos I/I con una frecuencia genotípica de 8.16 %, cinco individuos heterocigotos I/D (10.2%) y 40 individuos homocigotos D/D (81.63%); En el grupo de **controles** (37 individuos) se encontró un individuo homocigoto I/I (2.7%), dos individuos heterocigotos I/D (5.41%) y 34 individuos homocigotos D/D (91.9%); En el grupo de **población general** (28 individuos) se encontraron nueve individuos homocigotos I/I (32.14%), 12 individuos heterocigotos I/D (42.86%) y siete individuos homocigotos D/D (25%) (Cuadro 10).

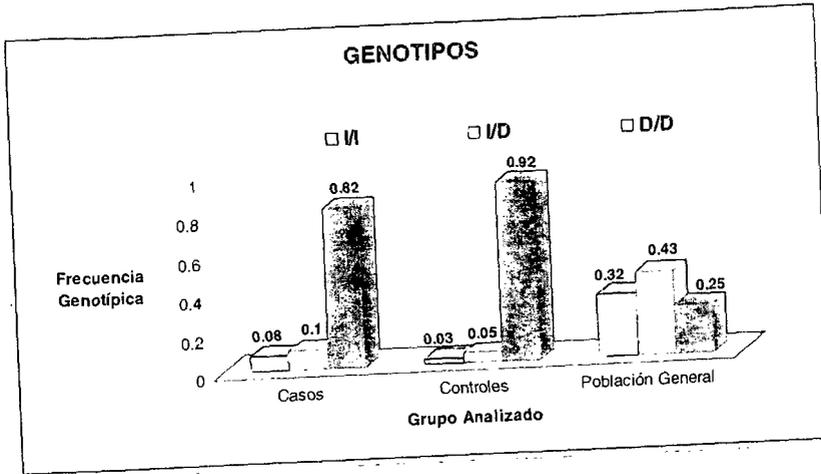
| GRUPO | N | Genotipos | | | Alelos | | Cr. |
|-------------------------------|----|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----|
| | | I/I | I/D | D/D | I | D | |
| Casos mama | 49 | 4 (8.16%) | 5 (10.2%) | 40 (81.63%) | 13 (13.27%) | 85 (86.73%) | 98 |
| Controles mama | 37 | 1 (2.7%) | 2 (5.41%) | 34 (91.9%) | 4 (5.405%) | 70 (94.59%) | 74 |
| *Población General | 28 | 9 (32.14%) | 12 (42.86%) | 7 (25%) | 30 (53.57%) | 26 (46.43%) | 56 |

Cuadro 10. Distribución y frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismo I/D del gen de la ECA.

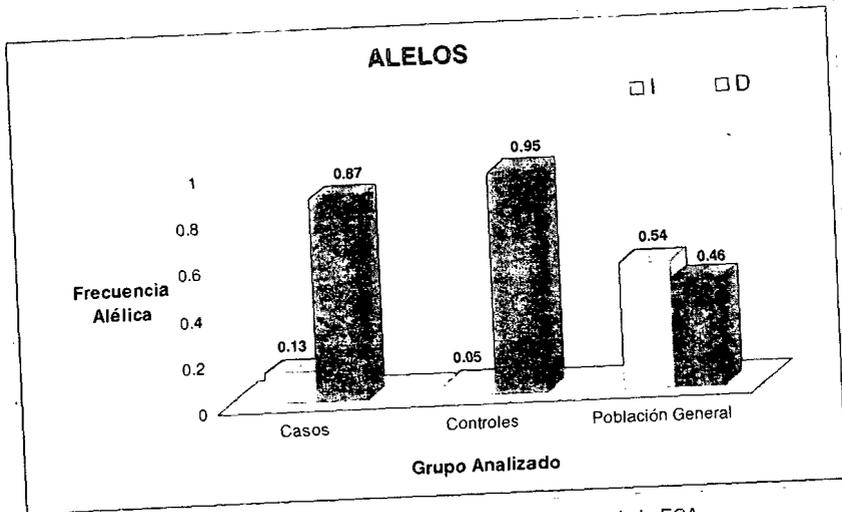
*Similar al presentado por Valdez y cols³².

La frecuencia alélica para el grupo de **casos** (98 cromosomas) fue de 13 cromosomas para el alelo I (13.27%) y 85 cromosomas para el alelo D (86.73%); para el grupo de **controles** (74 cromosomas) se encontraron 4 cromosomas para I (5.405%) y 70 cromosomas para D (94.59%); para el grupo de **población general** (56 cromosomas) se encontraron 30 cromosomas para I (53.57%) y 26 cromosomas para D (46.43%) (Cuadro 10).

Los resultados obtenidos de la frecuencia genotípica y alélica para el polimorfismo I/D del gen de la ECA se muestran a manera de gráficas (Figura 8 y 9).



Gráfica 1 (Figura 8). Frecuencia Genotípica del polimorfismo I/D del gen de la ECA.



Gráfica 2 (Figura 9). Frecuencia Alélica del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

IX.2 Análisis estadístico

Se realizó la comparación de los grupos de casos contra controles, casos contra población general y controles contra población general, con la prueba de χ^2 para las frecuencias genotípicas y alélicas.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico para los **genotipos** fueron:

El grupo de **casos contra controles** arrojó una J^2 de 1.9353 con una p de 0.4082; el grupo de **casos contra la población general** arrojó una J^2 de 24.03 con una significancia de 0.0000; el grupo de **controles contra la población general** arrojó una χ^2 de 30.6651 con una significancia de 0.0000 (Cuadro 11).

| GENOTIPOS | χ^2 | P | Significancia |
|------------------------------------|----------|--------|---------------|
| Casos vs Controles (T) | 1.9353 | 0.4082 | NS |
| Casos vs Población General (S) | 24.03 | 0.0000 | S |
| Controles vs Población General (S) | 30.6651 | 0.0000 | S |

Cuadro 11. Análisis estadístico de la χ^2 y la significancia para los genotipos del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico para los **alelos** fueron:

El grupo de **casos contra controles** arrojó una χ^2 de 2.9244 con una significancia de 0.1137; el grupo de **casos contra la población general** arrojó una χ^2 de 28.7664 con una significancia de 0.0000; el grupo de **controles contra la población general** arrojó una χ^2 de 38.2908 con una significancia de 0.0000 (Cuadro 12).

| ALELOS | χ^2 | P | Significancia |
|------------------------------------|----------|--------|---------------|
| Casos vs Controles (T) | 2.9244 | 0.1137 | NS |
| Casos vs Población General (S) | 28.7664 | 0.0000 | S |
| Controles vs Población General (S) | 38.2908 | 0.0000 | S |

Cuadro 12. Análisis estadístico de la χ^2 y la significancia para los alelos del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

X. DISCUSIÓN

- Los resultados de este estudio obtenidos en el análisis del polimorfismo I/D del gen de la ECA comparados con los que presenta Koh y cols. son similares para la población general, encontrando mayor frecuencia del genotipo I/D; sin embargo, tanto para controles como para los casos hubo gran diferencia; se encontró que el grupo de casos cáncer de mama en el estudio de Koh tuvo mayor frecuencia el genotipo I/D, distinto a lo observado en este trabajo en donde hubo mayor frecuencia del genotipo D/D; sin embargo, Koh y cols. demostraron una mayor frecuencia del genotipo I/I en el grupo de casos al excluir a individuos con hipertensión, enfermedad coronaria o diabetes, patología estrechamente relacionada con el desarrollo de hipertensión arterial que podría ser un factor de confusión en el análisis de asociación del polimorfismo de la ECA con cáncer de mama. En el grupo de controles se presentó con mayor frecuencia el genotipo I/D a diferencia del resultado obtenido en este trabajo, en donde se encontró mayor frecuencia del genotipo D/D.

Los resultados presentados por Haiman y cols. tanto en el grupo de casos como en el de controles se presenta con mayor frecuencia el genotipo I/D en las diferentes etnias analizadas (afro-americanas, japonesas, latinas y blancas), contrario al resultado obtenido en este trabajo en donde se encontró en mayor frecuencia el genotipo D/D para ambos grupos.

- Es importante señalar que del grupo de pacientes analizados en este estudio, se desconoce cuántos cursan con Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus o enfermedad coronaria, enfermedades con alta frecuencia en la población del Noroccidente de México, por lo que sería necesario realizar este estudio conociendo esta información para descartar a estos factores de confusión. Por otra parte, los controles que utilizamos pertenecen a pacientes a las que por sospecha clínica de cáncer de mama se les realizó la biopsia correspondiente, sin embargo, el estudio histopatológico mostró un fenotipo "intermedio" entre el estado normal y el cáncer en este tejido.

- Por otra parte, dado que el polimorfismo se encuentra en un intrón (intrón 16), el producto proteico derivado de ambos alelos (I y D) es en teoría idéntico en estructura y función. Lo que no puede descartarse más que con la secuenciación génica, es si este polimorfismo está ligado a una mutación hasta ahora desconocida en la región codificadora, lo que permanece por ser determinado, sin embargo es probable que el tamaño del gen (27 exones) sea poco conveniente para realizar esta estrategia metodológica.
- Los resultados obtenidos de los casos y controles en donde se encontró gran similitud, en comparación con la población general difieren debido a que en este grupo (población general) se mantiene el equilibrio en las frecuencias genotípicas (I/I, I/D, D/D) del polimorfismo I/D del gen de la ECA, el cual se debe a que el grupo de la población general consta de muestras de personas voluntarias en las que no se realizó ninguna encuesta para saber si tienen antecedentes personales o familiares de cáncer de mama, de ahí que es incierto saber que padece cada uno de los muestreados, reflejándose en un equilibrio para los genotipos y una diferencia para los casos y controles del mismo tejido, ya que éstos por sí mismos presentan un fenotipo que puede considerarse intermedio del desarrollo del cáncer de mama. Sería por lo tanto conveniente analizar el polimorfismo en muestras de sangre y tejido de las mismas pacientes, lo cual no fue posible en el presente estudio ya que las biopsias fueron obtenidas del archivo de Patología Clínica y las pacientes ya habían recibido tratamiento con quimio o radioterapia (o ambas).
- De acuerdo a la bibliografía y a los resultados observados, la expresión del alelo D se ve influenciado con los niveles de la enzima convertidora de angiotensina, favoreciendo que la ECA hidrolice en mayor volumen la angiotensina II ayudada de su receptor AT1, en donde éste favorece la proliferación de células de mama, la angiogénesis y metástasis.

- Con base en los resultados obtenidos se presume que aquel individuo con características clínicas previas al desarrollo del cáncer de mama y con la detección del alelo D por medio de PCR se puede decir que funcionaría como un marcador genético para predecir el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

XI. CONCLUSIONES

- ✓ Las frecuencias genotípicas del polimorfismo I/D en el gen de la ECA en mujeres del Noroccidente de México con cáncer de mama son I/I: 0.08, I/D: 0.1 y D/D: 0.82.
- ✓ Las frecuencias alélicas son I: 0.13 y D: 0.87.
- ✓ Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA en biopsias del mismo tipo de tejido sin cáncer de mama (controles) son similares a las encontradas en el grupo de casos (I/I: 0.03, I/D: 0.05 y D/D: 0.92). Las frecuencias alélicas son I: 0.05 y D: 0.95. Sin embargo debe considerarse que el fenotipo histológico en el grupo de controles, es intermedio al desarrollo de cáncer de mama.
- ✓ Las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas al comparar casos y controles con población general, permiten concluir que el alelo D puede ser un marcador genético predictivo de cáncer de mama en la población estudiada.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Vicent T. DeVita, Jr. Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. *Cáncer, principios y práctica de oncología*. 2000. Volumen I-2. Ed panamericana. 5ª edición.
2. Cancer. WHO cancer control programme. 2005. World Health Organization. <http://www.who.int/cancer/en/>. Consultado 16-01-2005.
3. El cáncer de glándula mamaria en México. 1997. Geocities. <http://www.geocities.com/HotSprings/Villa/1315/brcamex.htm#INTRODUCCION>. Consultado 15-06-2004.
4. Mortalidad 2003. Secretaria de Salud. <http://www.salud.gob.mx>. Consultado 15-06-2004.
5. Talamini R., Franceschi S., Favero A., Negri E., Parazzini F. and La Vecchia, C. Selected medical conditions and risk of breast cancer. *Br. J. Cancer*, 75: 1699-1703, 1997.
6. Lever A. F., Hole D. J., Gillis C. R., McCallum I. R., McInnes G. T., MacKinnon P. L., Meredith P. A., Murray L. S., Reid J. L. and Robertson J. W. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet*, 352:179-184, 1998.
7. Robert M. B., Levy M. N. *Fisiología*. 2001. Tercera edición. Ed. Mosby.
8. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P. and Soubrier, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Investig.*, 86: 1343-1346, 1990.
9. Haiman C. A., Henderson S. O., Bretsky P., Kolonel L. N. and Henderson B. E. Genetic Variation in Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort. *Cancer Research*. 63: 6984-6987, 2003.
10. Fujita M., Hayashi I., Yamashina S., Itoman M. and Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294: 441-447, 2002.
11. Finn Geneser. *Histología*. 2003. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

12. Dr Fernando Quiroz Gutiérrez. Anatomía Humana. 2002. Ed. Porrúa. México D.F. Trigesimooctava edición.
13. Kirby I. Bland, Edgard M. Copeland, III. La mama, Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2000. Editorial médica panamericana. Madrid España. Segunda edición. Tomo I.
14. A. Fernández-Cid. Mastología. 2000. Ed. Masson. Barcelona España. 2ª edición.
15. Philip Rubin. Oncología Clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 2003. Editorial Elsevier España. 8va edición.
16. Barry W. Feig, David H. Berger, George M. Fuhrman. M. D. Anderson Oncología. M.D. Anderson Cancer Center Department of Surgical Oncology Houston, Texas. 2000. Ed. Marban. Segunda Edición.
17. Compendio de Cáncer. Mortalidad/Morbilidad, Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. 2000. Secretaria de Salud.
18. Registro estatal del cáncer Jalisco 2003. Dirección general de planeación, Departamento de estadística. Proporcionado por la SSA-Jalisco. 02-05-2005.
19. William F. Ganong. Fisiología médica. 1996. Ed. El manual moderno. México D.F.
20. Hubert C., Houot A.M. Corvol P. and Soubrier F. Structure of the Angiotensin I-converting Enzyme Gene. The Journal of Biological Chemistry. 266: 15377-15383. 1991.
21. Koh W. P., Yuan J. M., Sun C. L., van den Berg D., Seow A., Lee H. P. and Yu M. C., Angiotensin I-Converting Enzyme (ECA) Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk among Chinese Women in Singapore. Cancer Research. 63:573-578. 2003.
22. Ichiki. T. Role of Renin Angiotensin System in Angiogenesis: It Is Still Elusive. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24: 622-624. 2004.
23. Rigat B., Hubert C., Corvol P., and Soubrier.F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensina converting enzyme gene (DPC1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acid Research. 20:1433.
24. Wright D. K., Manos M. M., Sample Preparation From Paraffin-Embedded Tissues En: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J. PCR

- Protocols. A Guide to Methods and Applications. Ed. Academic Press, Inc. USA. 1990. Pp. 153-158.
25. Gustincih S., Del Sal G. Schneider C. A Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotchniques*. 1998;11:298.
 26. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Laboratory Press 3^o edition. New York. 2001.
 27. Sanguinetti C. J., Díaz Neto E. and Simpson A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide. *Short Technical Reports*. 1994. 17:916.
 28. Crisan D. and Carr J. Angiotensin I-Converting Enzyme, Genotype and Disease Associations. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2000. 2:105-115.
 29. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal Medical*. 1991.324:1-8.
 30. Guevara PG. Cáncer y evolución. Disponible en:
<http://www.deslinde.org.co/Dsl27/Cancer.htm>. Acceso el 04 de Septiembre de 2003.
 31. Bal KJE, Puricelli L I. ¿Por qué se disemina el cáncer?. *Ciencia Hoy* 13 (17):48-55.2003.
 32. Valdez L. L., Quintero A., Garcia E., Olivares N., Celis A., Rivas Jr. F, and Rivas F. Thrombophilic polymorphisms in preterm delivery. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2004.

XIII. APÉNDICE

TÉCNICAS

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA²⁴

Equipo

- Microcentrífuga

Material

- Portaobjetos
- Bisturí
- Tubos Eppendorf de 2.0 ml.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Pipetas Pasteur
- Pipeta graduable de 50-100 μ l.
- Pipeta graduable de 100-1000 μ l.
- Putillas rosas
- Puntillas azules

Reactivos

- Octano
- Etanol al 100 % Acetona Solución Stock de proteinasa (20 mg/ml)
- Buffer de digestión (Trisma base 50 mM y Tween 20 al 0.5 %).

Procedimiento

1. Realizar un corte esquinado en el bloque de parafina y colocarlo sobre un parafilm limpio. Quitar del tejido el exceso de parafina con ayuda de un bisturí.
2. Cortar el tejido en fragmentos pequeños y colocarlos en un tubo Eppendorf de 2.0 ml.
3. Agregar 1 ml de octano, mezclar y dejar a temperatura ambiente por 30 min. Mezclando.
4. Centrifugar 3 a 5 min. A velocidad máxima (14,000 rpm).
5. Retirar el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur y repetir los pasos 3 y 4.
6. Agregar 500 μ l de etanol al 100 % y mezclar por inversión.

7. Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima.
8. Retirar el sobrenadante y repetir los pasos 6 y 7.
9. Retirar el etanol y agregar 2 o 3 gotas de acetona. Mantener los tubos abiertos y colocarlos en baño María a 37-50 °C hasta evaporación.
10. Una vez seca la muestra, añadir 100 µl de solución de proteinasa K (200 µg/ml en buffer de digestión). Si la muestra es abundante agregar 200 µl.
11. Incubar por 3 hrs a 55°C o a 37 °C toda la noche.
12. Centrifugar 3 segundos para bajar el líquido de la tapa.
13. Incubar a 95 °C por 8 a 10 min. Evitar calentar más de 10 min. (Puede realizarse este paso en el termociclador, para lo cual debe colocarse la muestra en un tubo Eppendor de 0.5 ml.)
14. Centrifugar 30 seg. Cuantificar el ADN por espectrofotometría o guardar la muestra a -20°C.

MICROMÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE COMPLETA (DTAB/CTAB)²⁵

Equipo

- Baño María a 68°C
- Microcentrifuga

Material

- Guantes desechables
- Cubrebocas
- Gasas
- Tubos para microcentrifuga de 2.0 mL con tapón de rosca
- Tubos para microcentrifuga de 1.5 mL
- Pipeta graduable de 10-100 µL
- Pipeta graduable de 100-1000 µL
- Puntillas amarillas
- Puntillas azules.

Reactivos

- Buffer de lisis: DTAB al 8 % (bromuro de dodecil trimetil amonio) en: Trisma base 10mM pH 8.6, NaCl 1.5 M y EDTA 50 mM.
- Cloroformo
- CTAB al 5 % (bromuro de hexadecil trimetil amonio) en NaCl 0.4 M. NaCl 1.2 M
- Etanol 100 %
- Etanol 70 %.

Procedimiento

1. Colocar 300 μ L de sangre completa (recolectada en un tubo con EDTA) en un tubo para microcentrífuga de 2.0 mL.
2. Agregar 600 μ L de buffer de lisis y agitar suavemente por inversión.
3. Colocar 5 minutos en baño María a 68°C.
4. Agregar 900 μ L de cloroformo. Tapar bien el tubo y agitar vigorosamente durante 5 min.
5. Centrifugar 15 min a 10,000 rpm. En este paso se formarán tres capas: la inferior formada por cloroformo, una intermedia en la que se encuentran las membranas y dentritos celulares y la superior acuosa que contiene el ADN.
6. Recuperar la fase acuosa y agregar 100 μ L de CTAB y 900 μ L de agua. Agitar suavemente por inversión durante 2 min.
7. Centrifugar 10 min a 10, 000 rpm.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 μ L de NaCl 1.2 M.
9. Agregar 750 μ L de etanol al 100% y agitar moderadamente. En este paso se precipita el ADN y es el ÚNICO en el que puede pararse el procedimiento, siempre y cuando los tubos se mantengan a -20°C.
10. Centrifugar 15 min a 10,000 rpm.
11. Decantar el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol al 70%. Agitar moderadamente y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
12. Repetir el paso anterior dos veces (tres lavados en total).
13. Evaporar el etanol sobrenadante colocando los tubos abiertos en baño María a 55-60°C.
14. Resuspender la pastilla en 300 μ L de agua inyectable.

CUANTIFICACIÓN DE ADN²⁵ (Método Espectrofotométrico)

Para cuantificar la cantidad de ADN deben tomarse las lecturas de la densidad óptica a 260 nm y 280 nm. La lectura de la muestra a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ADN en la solución. Una DO de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de ADN de doble cadena, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla y ARN, y alrededor de 20 µg/ml de oligonucleótidos de cadena sencilla. La tasa entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN o ARN tienen valores de DO_{260}/DO_{280} de 1.8 y 2.0, respectivamente. Si hay una contaminación con proteínas o fenol, la tasa DO_{260}/DO_{280} será significativamente menor y por lo tanto no será posible la cuantificación exacta del ácido nucleico.

Para realizar el cálculo de la concentración de ADN se utiliza la siguiente fórmula:

$\text{ng}/\mu\text{L} = (50) (\text{FD}) (\text{DO a } 260 \text{ nm})$ en donde:

FD = Factor de dilución = Volumen total de la celda

Volumen de la muestra

50 = Constante para ADN (DO 1 = 50 ng/ µL).

Equipo

- Gene Quant (Pharmacia)

Material

- Celdillas de cuarzo de 0.5 mL
- Pipeta graduable de 0.5-10 µL
- Pipeta graduable de 100-1000 µL
- Puntillas blancas
- Puntillas amarillas
- Puntillas azules
- Gasas
- Parafilm

Procedimiento

1. Ajustar el equipo verificando que los parámetros programados correspondan a la determinación de ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Colocar 500 μL de agua inyectable en la celdilla de cuarzo y tomar las lecturas de referencia del blanco a 260nm.
3. Agregar a la celdilla con agua 1 μL de ADN que se desea cuantificar. Tapar con papel parafilm y agitar suavemente. No deben formarse burbujas.
4. Indicar al aparato que se leerá una muestra y obtener los valores de absorbancia a 260 nm/280 nm, pureza y concentración de ADN.
5. Repetir los pasos 2 al 4 con cada muestra.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)²³**Equipo**

- Termociclador
- Microcentrífuga

Material

- Guantes
- Tubos para microcentrífuga de 0.5 mL
- Pipeta graduable de 0.5-1 μL .
- Pipeta graduable de 100-1000 μL
- Puntillas blancas
- Puntillas amarillas
- Puntillas azules

Reactivos

- Buffer de la enzima *Taq polimerasa*
- Desoxinucleótidos (A, C, G, T) trifosfatados (dNTPs)
- Cloruro de magnesio
- *Taq polimerasa*
- Agua inyectable
- ADN
- Aceite mineral

- Iniciadores específicos para el gen de la ECA (Rigat y cols):

5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'

5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'

Procedimiento

1. Calcular los reactivos de acuerdo al número de reacciones según las condiciones originales de reacción que se muestra en el cuadro 11.
2. Colocar la cantidad de ADN (de acuerdo a cada condición) en cada tubo previamente rotulado con el número de muestra y fecha de realización.
3. En un tubo por separado colocar las cantidades necesarias de cada componente de la reacción de acuerdo a lo calculado.
4. Distribuir el coctel de amplificación en los tubos con el ADN, cerrar y agitar suavemente para que se mezclen todos los reactivos.
5. Centrifugar 5 seg.

| Reactivo | [inicial] | [final] | $\mu\text{L}/\text{rx}$ |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Buffer | 10 X | 1 X | 1.25 |
| ECA 1 | 2 pmol/ μL | 2.4 pmoles/rx | 1.2 |
| ECA 2 | 2 pmol/ μL | 2.4 pmoles/rx | 1.2 |
| dNTPs | 10mM | 2mM/rx | 1.0 |
| MgCl ₂ | 50mM | 3mM/rx | 1.5 |
| Agua | Destilada | Cbp 12.5 μL | 5.3 |
| Taq polimerasa | 5U/ μL | 1U/rx | 0.05 |
| ADN | 100ng/ μL | 100 ng/rx | 1.0 |

Cuadro 13. Condiciones químicas de amplificación del gel de la ECA.

Agregar una gota de aceite mineral para evitar la evaporación y colocar en el termociclador programado con los siguientes parámetros (Cuadro 12):

| Paso | Temperatura °C | Tiempo | Descripción |
|------|----------------|------------|---------------------------|
| 1 | 94°C | 5 min | Desnaturalización inicial |
| 2 | 94°C | 1 min | Desnaturalización |
| 3 | 58°C | 1 min | Alineamiento |
| 4 | 72°C | 2 min | Extensión |
| 5 | 30 ciclos | | Amplificación |
| 6 | 72°C | 10 min | Extensión final |
| 7 | 4°C | Indefinido | Mantenimiento |

Cuadro 14. Condiciones de temperatura y ciclos de amplificación para el polimorfismo I/D del gen de la ECA.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA²⁶

Los geles de poliacrilamida más utilizados para analizar productos amplificados o de digestión, se preparan a partir de una solución al 30% (29 g de acrilamida y 1 g de N-N'- metilénbisacrilamida) que debe permanecer en un envase obscuro a temperatura ambiente.

Precaución: la acrilamida es un potente neurotóxico que se absorbe a través de la piel. Sus efectos son acumulativos. Es imprescindible usar guantes y mascarilla protectora en el momento de prepararla. Se considera que la poliacrilamida (polimerizada) no es tóxica. Sin embargo deben tomarse las mismas precauciones considerando la posible existencia de acrilamida no polimerizada.

Esta metodología es más sensible, tiene un mayor poder de resolución y da una copia permanente del experimento secando el gel. Las mayores desventajas del uso de estos geles son que sus componentes (poliacrilamida y bisacrilamida) no polimerizados son neurotóxicos, tanto por la piel como por la inhalación del polvo además que requieren más tiempo de preparación, y son relativamente más frágiles para su manejo que los geles de agarosa.

El gel se forma por la polimerización de grupo vinilo de monómeros de acrilamida, y consiste en largas cadenas de poliacrilamida cruzados al azar de un cromonómero bifuncional, usualmente N,N-metilén-bis-acrilamida (bis). La reacción produce cadenas al azar de poliacrilamida que incorporan una pequeña proporción de moléculas bis, formando una malla tridimensional por la que se mueve el ADN.

La concentración de acrilamida determina el promedio de longitud de la cadena polimerizada, y la concentración de bis determina la cantidad de puentes cruzados formados. La polimerización de los monómeros procede por un mecanismo de formación de radicales libres que es iniciado por un catalizador. El más empleado es el persulfato de amonio, que produce los radicales de oxígeno libre por un proceso a su vez catalizado por una base; las más utilizadas para acelerar esta reacción son la aminas alifáticas terciarias N, N, N', N'-tetrametil etilen diamina (TEMED). Entre las proporciones de acrilamida: Bis más comúnmente usadas son 29:1 y 19:1, y en una concentración del 4 al 12 %. Los geles de poliacrilamida se preparan según el porcentaje deseado en el mismo buffer de corrimiento que debe por lo tanto quedar a una concentración final 1X.

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA²⁷

La tinción con nitrato de plata de geles de poliacrilamida, aún cuando es más laboriosa y más costosa que la tinción con bromuro de etidio, proporciona una mayor nitidez de los fragmentos analizados, por lo que aumenta también la sensibilidad y resolución, que facilitan a su vez la interpretación de resultados, además de permitir conservar el gel por tiempo prolongado, ya que es posible secarlos sobre papel absorbente y guardarlos por un período de 1 a 6 meses. Otra ventaja de esta tinción es que no utiliza reactivos peligrosos, sin embargo deben usarse guantes cuando se trabaje con esta tinción, ya que los genes pueden quedar marcados con la grasa natural de los dedos.

Reactivos

- Solución fijadora: Etanol 10%, Ac. Acético 0.5 %.
- Solución de tinción: Nitrato de Plata 0.2 % en solución fijadora.
- Solución reveladora NaOH 3.0% y Formaldehído 0.5%.

Procedimiento

1. Colocar el gel en solución fijadora durante 5 minutos en agitación. Decantar el líquido.
2. Agregar solución de tinción suficiente para cubrir el gel y agitar durante 5 minutos. Decantar el líquido.

3. lavar con agua destilada durante 3 minutos para quitar el exceso de tinción.
Decantar el líquido.
4. Agregar solución reveladora y mantener en agitación hasta que aparezcan las bandas.
5. Enjuagar con agua corriente.

Comentarios

- El tiempo de fijación puede aumentarse a media hora y nos mejora la tinción, aclara más el fondo del gel, a un color amarillo que contrasta mejor con las bandas.
- Es importante el movimiento al hacer el enjuague, para que se quite bien el exceso de plata y la tinción del gel tenga una resolución más clara.
- Para mejorar el rendimiento de los reactivos se puede reciclar la solución fijadora del primer paso, y utilizarse para diluir la plata o al final para detener el revelado, y el resultado de la tinción no cambia.