



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



"Identificación de marcadores tumorales de preferencia metastásica de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas, positivas a HER-2, CK17 Y MAM-α"

TESIS QUE PRESENTA:

Esmeralda Morán Mendoza

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

Director:

Dra. María del Rocío Thompson Bonilla

Laboratorio de Medicina Genómica,
Hospital Regional "1º de Octubre", ISSSTE

Asesor:

Dra. Raquel Retana Ugalde

Jefa de la carrera de QFB,
Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi familia:

Por su apoyo incondicional...

A mis amigos:

Por su preocupación...

A mis tutoras:

Por su guía...

A las personas que sin tener obligación de ayudarme estuvieron conmigo...

GRACIAS

“Aprender es un rito, una costumbre
no le hace mal a nadie ni se olvida
aprende quien asciende hasta la cresta
pero también quien busca entre las ruinas”.

Mario Benedett

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo”.

Benjamin Franklin

Agradecimientos

Gracias a la UNAM y en especial a la FES “Zaragoza” por la oportunidad de pertenecer a la Máxima Casa de Estudios del país, lo cual implica un orgullo incomparable.

Gracias al ISSSTE por permitir una estancia si bien larga, productiva. Por aceptar alumnos con sed de conocimiento, gracias.

Gracias a las personas que ayudaron en mi formación académica y profesional fuera de la facultad: Dr. Juan Antonio González Barrios y a mis asesoras, la Dra. Ma. del Rocío Thompson Bonilla y la Dra. Raquel Retana Ugalde. Así como también un agradecimiento especial a mis sinodales: Dra. Martha Legorreta Herrera, Q.F.B. Francisco Javier Parada García y M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, por el tiempo y la paciencia dedicados para la revisión de mi tesis.

Quiero agradecer a mis amigos y compañeros: Manuel, Celia, Hayde, Selene, Tanya, Norma, Sergio, Jorge, José Luis, Marylin, Nishi, Aby, Caro, Julio, Pignon, en fin, la lista es larga. Gracias por escuchar y motivar.

En especial quiero agradecer a mi familia:
Por creer siempre en mí a pesar de las dificultades y malas decisiones...
Por ser pacientes conmigo y sobre todo, comprensivos...
Por saber escuchar y por preocuparse...
Por tener siempre una mano dispuesta a levantarme...
A mi papá, a mi mamá y a mis cinco hermanos: Elizabeth, Samuel, Daniel, Verónica y David, a quienes quiero y admiro mucho.

“La gratitud es la memoria del corazón”.

A todos, **GRACIAS!**

Un agradecimiento y reconocimiento especial al ISSSTE por el financiamiento del proyecto “Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas que acuden a donar sangre” del cual se desprende esta tesis.



Quiero además agradecer el impulso, dedicación y colaboración otorgados por el Dr. Juan Antonio González Barrios para la elaboración del artículo de revisión titulado “Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico”, publicada en la Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas de la Institución. Lo anterior como parte de mi formación dentro del Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital “1º de octubre” del ISSSTE.

Tabla de Contenido

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumen	xi
Referencias	1
1 Marco teórico	1
1.1 Cáncer de mama	1
1.1.1 Clasificación radiológica	1
1.1.2 Estadificación	2
1.1.3 Clasificación histopatológica	4
1.1.4 Clasificación molecular	7
1.1.5 Epidemiología	8
1.1.6 Historia Clínica	9
Resonancia Magnética	14
Tomografía	15
Biopsia	16
1.1.7 Tratamiento	17
Quirúrgico	17
Quimioterapia	18
Radioterapia	20
Terapia endócrina u hormonoterapia	20
1.1.8 Pronóstico	21
1.1.9 Biología celular del cáncer de mama	21
1.1.10 Teoría monoclonal molecular	22

1.1.11	Teoría monoclonal celular	24
2	Células Tumorales Circulantes	26
2.1	Definición	26
2.1.1	Diferenciación	27
2.1.2	Identificación	28
2.1.3	Valor pronóstico	29
2.1.4	Valor terapéutico	29
3	Células tumorales diseminantes	31
3.0.5	Valor pronóstico	31
3.0.6	Valor diagnóstico	32
3.0.7	Valor terapéutico	32
4	Marcadores Moleculares	34
4.1	CK-17	34
4.2	MAM- α	35
4.3	HER-2	36
5	Preferencia metastásica	39
6	Justificación	44
7	Objetivos	46
7.1	Objetivo General	46
7.2	Objetivos Particulares	46
8	Hipótesis	47
8.1	Conjunto de Hipótesis	47
8.1.1	Hipótesis 1	47
8.1.2	Hipótesis 2	47
8.1.3	Hipótesis 3	47
9	Metodología	48
9.1	Tipo de estudio	48
9.2	Selección de la muestra	48
9.3	Tamaño de la muestra	48
9.4	Pacientes	48
9.5	Criterios de selección de pacientes	49
9.5.1	Criterios de inclusión para la muestra de sangre	49
9.5.2	Criterios de exclusión para la muestra de sangre	49

9.5.3	Criterios de eliminación para la muestra de sangre	49
9.6	Controles positivos	49
9.7	Obtención de la muestra sanguínea	49
9.7.1	Flebotomía	50
9.7.2	Fraccionamiento	51
9.8	Separación de células nucleadas	52
9.9	Extracción de RNA total	52
9.10	Retrotranscripción (RT)	53
9.11	Verificación del proceso de RT	53
9.12	RT-PCR en tiempo real para detectar CK-17, Mammaglobina A y HER2	54
9.12.1	Progresión y preferencia metastásica pulmonar	55
9.12.2	Normalización	55
9.13	Tamaño de la muestra	55
9.14	Análisis de resultados	56
10	Resultados	57
11	Discusión	67
12	Conclusiones	72
13	Observaciones generales	73
13.1	Diagnóstico	73
13.2	Preferencia metastásica	73
13.3	Pronóstico	73
13.4	Agresividad tumoral	74
13.5	Conclusión general	74
13.6	Perspectivas	74

Lista de Tablas

Tabla	Título	Página
1.1	Tumor primario (T)	3
1.2	Ganglios linfáticos regionales (N)	3
1.3	Metástasis distante (M)	3
1.4	Agrupación de estadios clínicos de acuerdo a su clasificación TNM. ¹⁰	4
1.5	Clasificación molecular del cáncer de mama.	7
4.1	Genes de diagnóstico molecular de cáncer de mama	38
9.1	Protocolo de termociclado para el gen β -Actina	53
10.1	Muestras estudiadas	57
10.2	Fenotipos de las muestras positivas a cáncer de mama	60
10.3	Marcadores de origen tumoral	62
10.4	Marcadores terapéuticos y pronósticos	64
10.5	Perfil transcripcional de preferencia metastásica	66

Lista de Figuras

Figura	Título	Página
1.1	Estructura de la glándula mamaria	5
1.2	Incidencia del cáncer de mama	8
1.3	Mortalidad del cáncer de mama	9
1.4	Mastografía digital	11
1.5	Ultrasonido diagnóstico	14
1.6	Resonancia magnética nuclear diagnóstica	15
1.7	Tomografía	16
1.8	Características de las células tumorales	23
1.9	Alteraciones epigenéticas:	25
2.1	Células tumorales circulantes y diseminantes	27
2.2	Historia natural del cáncer de mama	30
3.1	Curso temporal de las células tumorales circulantes y valor clínico	33
5.1	Preferencias metastásicas del cáncer de mama	40
5.2	Quimiocinas y Metástasis	42
10.1	Patrón de corrimiento electroforético de ARN total	58
10.2	Amplificación del gen de β -Actina por PCR de punto final	58
10.3	Panel de identificación	59
10.4	Distribución de muestras positivas a la identificación molecular de CTC's	60
10.5	Panel de origen tumoral	61
10.6	Panel de clasificación y pronóstico del cancer de mama	63
10.7	Preferencia metastásica	65

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
μL	Microlitros
BLC	Basal Like cancer (Cáncer parecido al basal)
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
CADM2	Cell adhesion molecule 2 (Adhesión molecular celular 2)
CEA	Carcinoembryonic Antigen (Antígeno carcinoembrionario)
CK	Citkeratin (Citoqueratina)
CSC	Cancer stem cell (Célula madre cancerígena)
CTC	Circulating tumoral cell (Célula Tumoral Circulante)
CXCL	Chemokine ligand
CXCR	Chemokine receptor
DFS	Disease-free survival (Supervivencia libre de enfermedad)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DTC	Disseminated tumor cell (Célula tumoral diseminante)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Factor de crecimiento epidérmico)
ESR1	Estrogen receptor 1 (Receptor a estrógenos 1)
FBP1	Fructosa-1,6-bifosfatasa
FSH	Hormona folículo estimulante
GBM	Grado biología molecular
HER2neu/erbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
hGH	Human Growth Hormone (Hormona de crecimiento)
HK2	Hexokinase 2 (Hexoquinasa 2)
ICC	Immunocytochemistry (Inmunocitoquímica)
ID (1 ó 2, a ó b)	Inhibition Binding of DNA
IGF	Insulin-like growth factor 1 (Factor de crecimiento epidérmico parecido a la insulina)
IHC	Immunohistochemistry (Inmunohistoquímica)
Mam- α	Mammaglobin alpha (Mamaglobina alfa)
MAGEA3	Melanoma-associated antigen 3
MMP	Matrix metalloproteinase (Metaloproteinasas de matriz)
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensajero)
NTSR1	Neurotensin receptor 1 (Receptor a neurotensina 1)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFS	Progression-free survival (Supervivencia libre de progresión)
PRLR1	Prolactin receptor 1 (Receptor a prolactina 1)

PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RE	Receptor a estrógenos
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
RP	Receptor a progesterona
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
SG	Supervivencia global
SNLC	Small cell lung cancer (Cáncer pulmonar de células pequeñas)
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase (Inhidores tisulares de las metaloproteinasas)
TFF1	Trefoil factor 1
TN	Triple negativo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

Resumen

EL cáncer de mama es una patología que afecta a millones de mujeres en el mundo. En nuestro país es la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 50 años y la primera por cáncer desde el año 2006. Cabe destacar que en los países en vías de desarrollo se registra el 45% de los decesos anuales.

Al ser una enfermedad heterogénea, su comportamiento clínico es variado por lo que su tratamiento debe adecuarse a la clasificación correspondiente. Sin embargo, es precisamente la heterogeneidad del cáncer de mama lo que hace difícil su diagnóstico por lo que, éste se realiza en estadios avanzados de la enfermedad. Generalmente las mujeres afectadas con esta patología descubren un problema en su autoexploración y es por esta razón que acuden a un médico. Para descartar o corroborar la sospecha clínica de cáncer, el médico tratante se auxilia de los métodos de imagen, los cuales a pesar de ser sensibles, al igual que cualquier método tienen sus limitantes. Además, una vez realizado el diagnóstico, las terapias son agresivas e incómodas para las pacientes y la incidencia de recaída es muy alta a pesar de la resección oportuna de los tumores sólidos, que puede deberse a las metástasis generadas por células tumorales circulantes o diseminantes (CTCs y DTCs, respectivamente).

Lo anteriormente expuesto muestra la necesidad de contar con métodos diagnósticos que nos permitan tomar decisiones médicas oportunas para las pacientes afectadas, y sobre todo en etapas tempranas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer un método diagnóstico molecular sensible, económico y reproducible, empleando sangre periférica para evaluar células tumorales circulantes y de esta manera adelantar el pronóstico así como el tratamiento, al predecir la preferencia metastásica de dichas células.

En el Banco de Sangre del Hospital Regional “1º de Octubre” del ISSSTE, se evaluaron 1501 muestras de mujeres donadoras de sangre consideradas sanas clínicamente de acuerdo a los parámetros establecidos para la donación, conforme a la NOM-253-SSA1-2012. Una vez que se consideró que dichas mujeres eran aptas para la donación, se les hizo saber del proyecto de investigación “Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas que acuden a donar sangre” y aquellas mujeres que mostraron interés por participar firmaron una carta de consentimiento informado. Después de haber realizado el proceso de flebotomía, la sangre fue fraccionada en sus diferentes componentes y el concentrado leucocitario se entregó para su procesamiento al personal del “Laboratorio de Medicina Genómica” del mismo hospital.

Se empleó el concentrado leucocitario para realizar una extracción del mRNA total con el método del trizol. Una vez obtenido el ácido nucleico, se verificó su integridad y se cuantificó, eliminándose las muestras degradadas. Se retrotranscribieron las muestras aptas y se verificó este proceso amplificando el gen constitutivo β -actina mediante PCR de punto final. Al obtenerse el amplicón esperado, se procedió a llevar a cabo una qPCR para evaluar la expresión de genes considerados para establecer una sospecha de cáncer

de mama. Éstos fueron MAM- α , HER-2 y CK17. Sólo se consideraron positivas aquellas muestras que amplificaron antes de 35 ciclos, resultando positivas 11 muestras.

Las muestras positivas a MAM- α se evaluaron con un panel ampliado de perfil molecular donde se incluyeron los genes ID1, PTGS2 y MMP2. Obteniéndose 6 fenotipos diferentes de células tumorales: 1) negativo a los tres marcadores; 2) positivo a los tres; 3) ID1 (-), MMP2 (+) y PTGS2 (+); 4) ID1 (-), MMP2 (-) y PTGS2 (+); 5) ID1 (+), MMP2 (-) y PTGS2 (+); y 6) ID1 (+), MMP2 (-) y PTGS2 (-).

Además se evaluó la expresión del gen NTSR1, el cual fue positivo en 10 de las 11 muestras estudiadas para este gen, lo que, de acuerdo a los estudios en los cuales se ha valorado NTSR1, advierte que el cáncer en dichas pacientes será agresivo y de rápida progresión. La expresión de NTSR1 permitirá el diseño de una terapia dirigida y personalizada para las pacientes.

La expresión de NTSR1 genera la perspectiva de enfocar una terapia génica empleando polyplex, lo cual permitiría tratar el principal problema del cáncer: las CTCs y DTCs. De esta manera podrían reemplazarse los tratamientos actuales que a pesar de ser agresivos no son eficiente para evitar las metástasis.

Palabras Clave: Cáncer de mama, CTCs, DTCs, Metástasis.

Marco teórico

1.1 Cáncer de mama

Desde el punto de vista biológico, el cáncer es una proliferación descontrolada de células, debido a la alteración del equilibrio en la programación normal de las mismas, lo que incluye las vías de señalización involucradas en el ciclo celular: proliferación, apoptosis, adhesión y metabolismo celular; de esta manera se crea una clona capaz de invadir tejido adyacente y propagarse hacia sitios distantes.¹

En la práctica médica, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que engloba distintas entidades con diferentes características biológicas y comportamientos clínicos.²

El cáncer de mama muestra una etiología genética, que puede originarse por mutaciones en las células de la línea germinal (hereditario), o en células somáticas (esporádico). De 5-10% de los casos diagnosticados se deben a cáncer de mama hereditario. Por lo que el cáncer de mama esporádico representa aproximadamente el 90-95% restante.³

El cáncer de mama hereditario se encuentra asociado a la presencia de mutaciones en los genes de susceptibilidad BRCA1 y BRCA2 presentes en las células de la línea germinal. Estudios realizados indican que existe un riesgo relativo aumentado de aproximadamente un 27% de padecer cáncer de mama debido a factores hereditarios.⁴

Las mutaciones en BRCA1/2 correlacionan directamente con el fenotipo basal, mientras que el cáncer no asociado a este gen se relaciona con el fenotipo basal A y ERBB2.⁵

1.1.1 Clasificación radiológica

El BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System) fue creado por el American College of Radiology para estandarizar el informe y lenguaje mastográfico y, de esta manera generar un entendimiento entre los especialistas implicados en el cáncer de mama. Además se ha empleado como herramienta en la mejora continua de la calidad en diagnóstico. En

dicho sistema, se categorizan las lesiones de la mama en función del grado de sospecha de malignidad, que van del 0 al 6. Así mismo, se establecen recomendaciones para el seguimiento de las lesiones.^{6, 7}

- † **Categoría 0.** Es una categoría de evaluación **incompleta**, por lo que es necesario realizar otros estudios de imagen para recategorizar el hallazgo.
- † **Categoría 1.** Corresponde a una mastografía **normal**. Se recomienda control rutinario periódico.
- † **Categoría 2.** Cuando se encuentra un hallazgo **benigno** como: fibroadenoma calcificado, calcificaciones de tipo secretor, lesiones con contenido graso o mixto. Se recomienda control rutinario periódico.
- † **Categoría 3.** Lesión probablemente **benigna**. Presenta nódulo sólido circunscrito sin calcificaciones, asimetrías focales, microcalcificaciones redondeadas o puntiformes y/o lesiones no palpables. Se recomienda control a los 6 meses y adicionales si precisa durante 2 años o más, para demostrar la estabilidad de la lesión.
- † **Categoría 4.** Se trata de un hallazgo que no exhibe aspecto de malignidad, pero la **probabilidad de malignidad** es lo suficientemente **alta**, por lo que la biopsia se debe considerar.
- † **Categoría 5.** Más del 95% de malignidad. Las lesiones más representativas de este grupo son masas de contornos irregulares y especulados.
- † **Categoría 6.** Para aquellos hallazgos en la mama **confirmados como malignos**. Debe realizarse la acción terapéutica más adecuada.

1.1.2 Estadificación

La estadificación describe la gravedad del cáncer de mama que aqueja a un paciente basándose en el tamaño o en la extensión del tumor original (primario) y si tiene o no, metástasis clínicas.⁸

Sistema TNM

El sistema TNM es uno de los sistemas de estadificación de cáncer de mayor uso. Este sistema se ha aceptado por la Union for International Cancer Control (UICC), y por el American Joint Committee on Cancer (AJCC). La mayoría de los establecimientos médicos usan el sistema TNM como método principal al dar algún informe sobre el cáncer.⁶

El sistema TNM se basa en el tamaño o extensión (alcance) del tumor primario (T) (Tabla 1.1), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) cercanos (Tabla 1.2), y la presencia de metástasis (M) (Tabla 1.3) o de tumores secundarios que se formen

Tabla 1.1: Tumor primario (T)

Clase	Características
TX	No es posible evaluar un tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ “CIS: células anormales están presentes pero no se han diseminado a los tejidos cercanos”. Aunque no es cáncer, el CIS puede convertirse en cáncer y algunas veces se llama cáncer preinvasor
T1-T4	Tamaño o extensión del tumor primario

Fuente: <http://www.cancer.gov>**Tabla 1.2:** Ganglios linfáticos regionales (N)

Clase	Características
NX	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe complicación de ganglios linfáticos
N1, N2 N3	Grado de complicación de los ganglios linfáticos regionales “número y localización de los ganglios linfáticos”

Fuente: <http://www.cancer.gov>**Tabla 1.3:** Metástasis distante (M)

Clase	Características
MX	No es posible evaluar una metástasis distante
M0	No hay metástasis distante
M1	Presencia de metástasis distante

Fuente: <http://www.cancer.gov>

por la diseminación de las células cancerosas a otras regiones del cuerpo. Un número se añade a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor primario y el grado de diseminación del cáncer. De esta manera se agrupan en estadios clínicos (Tabla 1.4) para elegir una terapéutica y observar el pronóstico.⁸

La última modificación a la clasificación TNM se llevó a cabo en el año 2010. En dicho documento se hace énfasis en el uso de imagenología (mastografía, ultrasonido y RM) como ayuda para determinar el tamaño del tumor primario⁸

Tabla 1.4: Agrupación de estadios clínicos de acuerdo a su clasificación TNM.¹⁰

Estadío	Tumor	Nódulo	Metástasis
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	Cualquier N	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Fuente: <http://www.cancer.gov>

1.1.3 Clasificación histopatológica

El componente básico del seno es la “glándula mamaria”. Cada glándula mamaria se compone de lóbulos conectados a conductos y al tejido fino circundante que incluye los vasos sanguíneos⁹ (Figura 1.1).

Los tumores malignos pueden presentarse en cualquiera de las estructuras mencionadas. Los carcinomas ductales son los más comunes, seguidos por los carcinomas lobulillares.

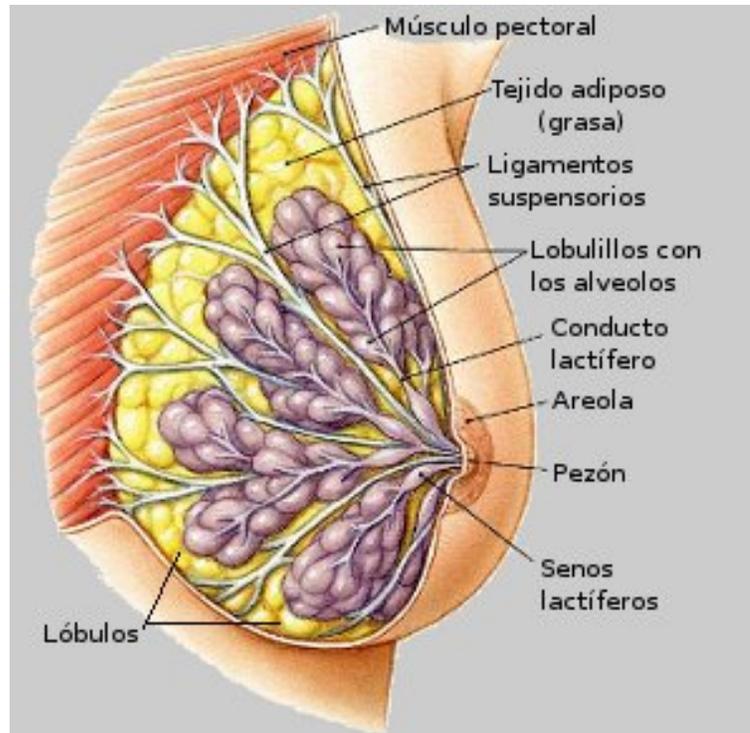


Figura 1.1: Estructura de la glándula mamaria: Esquema que muestra los componentes básicos de la mama.

Fuente: <http://www.sabelotodo.org/anatomia/mamas.html>

De acuerdo a la Comisión Americana Mixta Sobre el Cáncer (AJCC) la clasificación histológica del cáncer de seno es la siguiente:⁸

- Ductal
 - Intraductal (*in situ*)
 - Invasor con el componente intraductal predominante
 - Invasor, NOS (no especificado de otra manera)
 - Comedón
 - Inflamatorio
 - Medular con linfocítico infiltrante
 - Mucinoso (coloide)
 - Papilar
 - Sirroso
 - Tubular

- Otro
- Lobulillar
 - *In situ*
 - Invasor con el componente in situ predominante
 - Invasor
- Pezón
 - Enfermedad de Paget, NOS
 - Enfermedad de Paget con carcinoma intraductal
 - Enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasor
- Carcinoma sin diferenciación

Los carcinomas ductales invasores son caracterizados por sus bases sólidas, que son generalmente duras y firmes a la palpación. El carcinoma ductal invasor se extiende a los ganglios linfáticos regionales y comúnmente tiene el pronóstico más pobre entre varios tipos ductales. El grado nuclear e histológico ha demostrado ser un indicador eficaz del pronóstico.¹²

Hay cinco subtipos histológicos del DCIS, llamados comedón, papilar, micropapilar, cribriforme, y sólido. El subtipo comedón presenta alto grado alto nuclear, micro-invasión, y la sobre-expresión del oncogene HER-2/neu. La característica mamográfica más anormal asociada al DCIS es “microcalcificaciones en racimo”.¹²

Los carcinomas lobulares invasores son caracterizados por una mayor proporción de multicentricidad en el mismo seno o el opuesto. Las lesiones tienden a tener márgenes mal definidos, y la única evidencia es el espesamiento o induración sutil.¹³

El Carcinoma lobulillar “*in-situ*” (LCIS, por sus siglas en inglés) carece generalmente de muestras clínicas o mamográficas específicas, y ocurre con más frecuencia en mujeres antes de la menopausia. Por su definición, estas células de cáncer son confinadas a los lóbulos mamarios sin invasión. El LCIS es caracterizado microscópicamente por una proliferación sólida de células pequeñas. Las células tienen una tarifa proliferativa baja, tienen típicamente el receptor de estrógeno positivo, y raramente sobre-expresan el oncogene de HER-2/neu.¹³

El carcinoma medular se caracteriza por linfocitos prominentes infiltrantes. Las pacientes con el carcinoma medular tienden ser más jóvenes que las mujeres con otros tipos de cáncer de seno. El pronóstico también se cree ser mejor que para el cáncer ductal invasor.¹⁴

El carcinoma inflamatorio de seno es caracterizado por edema difusa de la piel, rojez de la piel y del seno y firmeza del tejido fino subyacente sin una masa palpable. La

manifestación clínica es sobre todo debido a la embolización del tumor a los canales linfáticos cutáneos (canales de la linfa de la piel) con congestión asociada a los capilares superficiales. El cáncer del seno inflamatorio tiene un mal pronóstico.¹⁵

La enfermedad de Paget del pezón es una forma rara de cáncer del seno que es caracterizada clínicamente por cambios en forma de eczema del pezón. Se cree que la enfermedad de Paget representa la migración de células malignas de los conductos mamarios subyacentes en el pezón. El pronóstico de pacientes con la enfermedad de Paget aparece ser similar al de mujeres con otros tipos de carcinoma del seno.¹⁶

1.1.4 Clasificación molecular

La variación en la programación transcripcional es la responsable, en la mayoría de los casos, de la diversidad biológica de los tumores.¹⁷ Por lo anterior, el tratamiento y pronóstico de los pacientes con cáncer de mama se realiza de acuerdo a los subtipos moleculares establecidos: tipo luminal A, luminal B, Her2 positivo, triple negativo, y tipo basal¹⁸ (Tabla 1.5).

La subtipificación tumoral de mama se realiza mediante un análisis de la expresión génica. Éste puede ser llevado a cabo con el empleo de microarreglos,¹⁹ o bien, utilizando una combinación de marcadores inmunohistoquímicos²⁰ o por técnicas de biología molecular como PCR de punto final o PCR en tiempo real.

Los resultados de diversos estudios han proporcionado evidencia de que los subtipos de tumores de mama representan entidades de la enfermedad biológicamente diferentes, por lo que requieren tratamientos con distintas estrategias terapéuticas.²¹

Tabla 1.5: Clasificación molecular del cáncer de mama.

Subtipo	RE	RP	HER-2	Ki-67
Luminal A	Positivo	y/o Positivo	Negativo	≤ 14%
Luminal B	Positivo	y/o Positivo	Negativo	≥ 14%
HER-2	Negativo	Negativo	Positivo	Cualquiera
TNBC	Negativo	Negativo	Negativo	Cualquiera

RE: Receptor a estrógenos.

RP: Receptor a progesterona.

HER2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2.

Ki-67: nuclear non-histone protein.

Fuente: Park 2012.²²

1.1.5 Epidemiología

La agencia internacional para investigación sobre el cáncer, en su último reporte estadístico, reveló que 1,677,000 mujeres se diagnosticaron con cáncer en 2012 y 577,000 murieron a causa directa de esta enfermedad.²³

La mortalidad del cáncer de mama en el mundo se estima en 411,000 decesos anuales, y se calcula que en los últimos 5 años 4.4 millones de mujeres se han diagnosticado con dicha patología. El 45% de los casos, así como la mayoría de las muertes por cáncer de mama, se registran en los países en vías de desarrollo.²⁴

En México, se estima que doce mujeres mueren diariamente por esta causa, es decir una tercera parte de todas las pacientes diagnosticadas. La mortalidad de esta enfermedad en nuestro país muestra un incremento constante; basta mencionar que en el período comprendido entre 1980 y 2005 se registraron un total de 67,854 defunciones, con un incremento anual del 3.6%²⁵ (Figura 1.1).

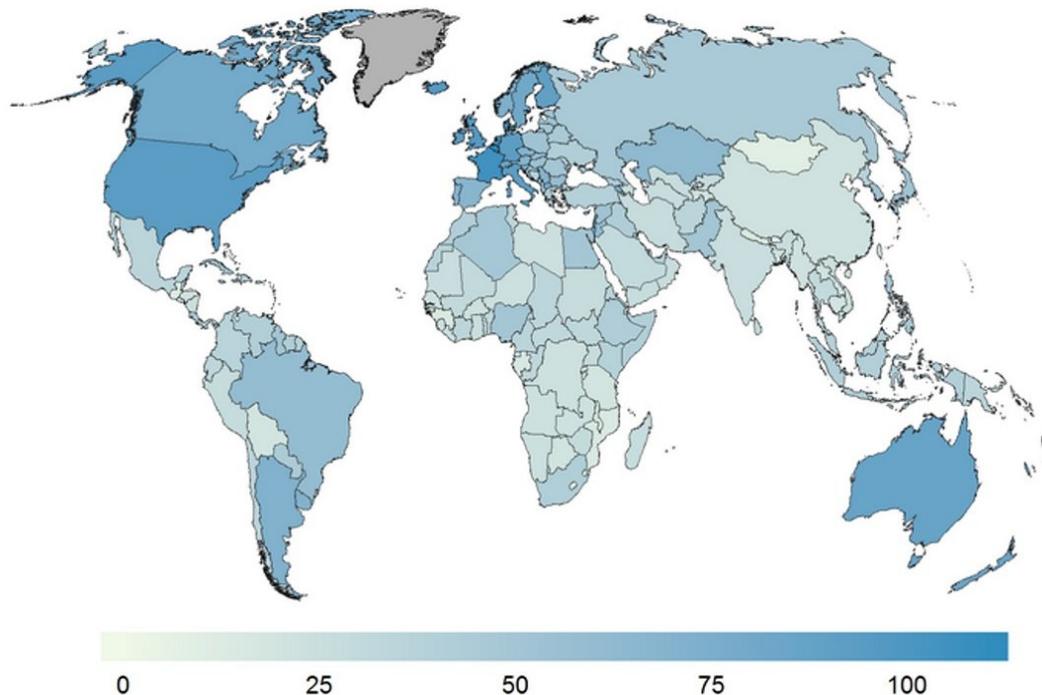


Figura 1.2: Incidencia mundial del cáncer de mama: La intensidad del color en la figura indica el impacto epidemiológico en cada país. Fuente: GLOBOCAN 2012.

La letalidad en los países de ingresos bajos, medio-bajo y medio-alto es 56%, 44% y 39% respectivamente; siendo alto comparado con el 24% observado en los países de ingresos altos²⁴ (Figura 1.2).

A partir de 2006 el cáncer de mama se ha convertido en la segunda causa de muerte

general en mujeres de 30 a 50 años; y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvico-uterino.²⁶

La frecuencia histopatológica del cáncer de mama es variable, los tumores *in situ* de origen ductal representan 5% del total, el lobulillar tienen una frecuencia del 2% y el microinvasor representa el 1%. Los tipos histopatológicos más comunes están encabezados por el carcinoma ductal sin un patrón específico y en conjunto representa el 72% de los casos, el lobulillar 12%, el tubular y/o cribiforme se presenta en el 3%, medular 1%, mucinoso 2% y otros tipos histológicos entre los que encontramos el adenoideo quístico, células en anillo de sello, apócrino, metaplásico, sarcomatoide y epidermoide los que en conjunto conforman el 2% de todos los tumores de mama.²⁷

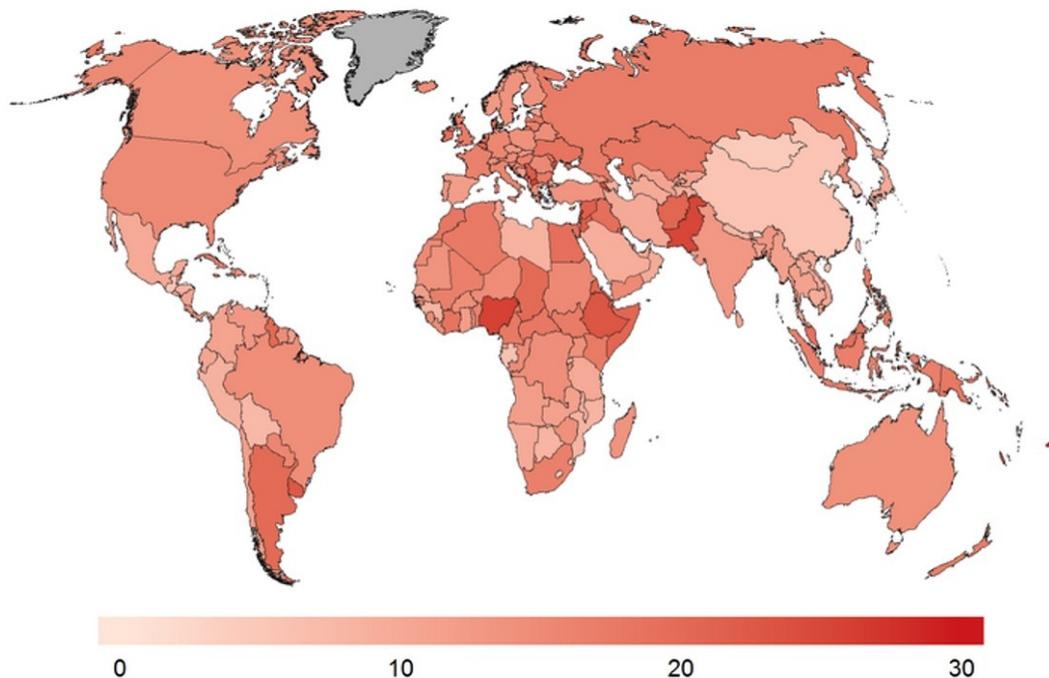


Figura 1.3: Mortalidad mundial del cáncer de mama: la intensidad del color en la figura indica el impacto epidemiológico en cada país. Fuente: GLOBOCAN 2012

1.1.6 Historia Clínica

Obtener una historia clínica detallada de la paciente permite identificar el historial de salud personal y familiar de la mujer, para determinar si existe la patología en la paciente o si ésta cuenta con factores de riesgo condicionantes, desencadenantes o de susceptibilidad a la patología.

Evaluación de riesgo

Los antecedentes heredo-familiares de la paciente están implicados en el padecimiento de cáncer, ya que existe un riesgo de 1.5-3 veces mayor de presentarlo si se tiene un familiar de primer grado que haya padecido cáncer de mama.²⁸

Los genes de susceptibilidad genética para el cáncer de mama y de ovario son BRCA1, el cual se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 específicamente en la banda 17q21, mientras que BRCA2 se codifica en el brazo largo del cromosoma 13 específicamente en la banda 13q13. Las mutaciones en esos genes se transmiten de manera autosómica dominante y se asocian a un riesgo del 85% de desarrollar cáncer de mama, sobre todo a edades tempranas.²⁹ En estudios previos se observó que la frecuencia de las mutaciones en dichos genes fue mayor en los casos de pacientes con CaMa diagnosticados antes de los 35 años, y con el aumento de número de familiares afectados con la patología. La penetrancia a los 80 años es de un 48% para los portadores de las mutaciones BRCA1 y del 74% para los portadores de la mutación BRCA2.³⁰

Las proteínas derivadas de la transcripción de los genes BRCA1 y BRCA2 desempeñan una función inhibitoria de las señales desencadenadas por las hormonas esteroideas en el epitelio de la mama; por lo que, una alteración en la función de dichas proteínas desencadena un descontrol sobre la señalización intracelular en la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis.³¹

La exposición excesiva a los estrógenos se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.³² En un estudio prospectivo donde se consideraron los niveles de hormonas sexuales, se estableció un riesgo relativo mayor en mujeres posmenopáusicas expuestas a estradiol.³³ De esta manera, una menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad o primigravidez tardía, así como terapia hormonal sustitutiva y uso de anticonceptivos hormonales, son factores que aumentan la incidencia del cáncer de mama.

Evaluación de acuerdo a la escala de Karnofsky

La escala de Karnofsky (KPS) es un indicador generalizado para estratificar el pronóstico del paciente y determinar una gestión adecuada. Permite conocer la capacidad del paciente para poder realizar actividades cotidianas. Los bajos valores de KPS preoperatorias se han asociado con supervivencia normal más corta.³⁴

Exploración física

Para realizar el examen clínico, el mejor momento es de cinco a siete días después de la menstruación.³⁵

1. En la primera parte de la exploración se observa la forma y simetría de ambas glándulas mamarias, así como el tamaño y posición, coloración, textura de la piel,

presencia de depresiones, nódulos, induraciones, integridad y forma, tanto de la areola, pezón y piel circundante³⁶.

2. Localización y tamaño de la tumoración.
3. Presencia y características de adenopatías.

Exploración general

En caso de paciente histerectomizada pero con preservación de ovarios, determinar los niveles hormonales de: FSH > 40; 17 β -Estradiol < 20 y Estrona > 40.

Mastografía

La mastografía es una imagen radiográfica de la glándula mamaria donde se reconocen lesiones pequeñas (≤ 0.5 cm).³⁷ Este tipo de estudio, permite detectar 4.7 casos por cada mil estudios realizados en mujeres de 40-49 años con historia familiar de cáncer, mientras que solamente se detectan 2.7 casos en mujeres sin antecedentes. En cambio, en mujeres de 50 a 59 años, se detectan 6.6 y 4.6 casos respectivamente.³⁸ Sin embargo, este método se considera el estándar de oro para realizar el diagnóstico.

Para el diagnóstico de anomalías del tejido mamario existen tres tipos de mastografía (Figura 1.3):

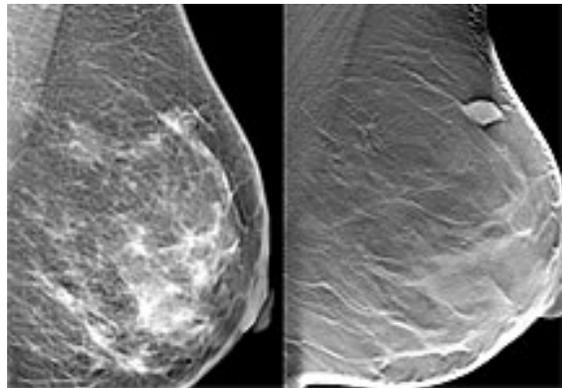


Figura 1.4: Mastografía digital: Es uno de los métodos diagnósticos más utilizados para el estudio de cáncer de mama, la figura muestra una fotografía representativa de los eventos mastográficos diagnósticos del cáncer de mama.

Mastografía de tamizaje Su objetivo es detectar mujeres sanas y asintomáticas a partir de los 40 años de edad. Debe comprender un seguimiento con base en los resultados de radiodiagnóstico.³⁷

Mastografía diagnóstica Se realiza en mujeres que presentan un estudio radiológico de tamizaje sospechoso o bajo alguna de las siguientes premisas:

- Masa o tumor palpable
- Secreción sanguinolenta del pezón
- Cambios en la piel del pezón o de la areola (Piel en cáscara de naranja)
- Mama densa
- Densidad asimétrica
- Distorsión de la arquitectura
- Microcalcificaciones sospechosas
- Ectasia ductal asimétrica³⁷

Mastografía oportunista Se efectúa en mujeres asintomáticas, por lo regular se indica por el personal de salud cuando las pacientes acuden a los servicios de salud por motivos no relacionados con patología de la mama.³⁷

La sensibilidad de la mastografía oscila de 71 a 96% y, la sensibilidad disminuye con mujeres menores de 50 años, debido a que la densidad del tejido de la mama aumenta en mujeres más jóvenes, por lo cual se dificulta la interpretación de la mastografía.³⁸

Los factores involucrados en la disminución de la sensibilidad son:

- A) **Características de los pacientes**, como la densidad mastográfica, uso de hormonas anticonceptivas o como terapéutica de reemplazo.
- B) **Factores técnicos** (Calidad del estudio).
- C) **Experiencia del radiólogo**, para interpretación de la radiografía sin propensión a clasificar los estudios como anormales por temor a equivocarse.

Por el contrario la especificidad es del 94 a 97%, lo que indica que el total de falsos positivos es muy bajo.³⁸

El personal técnico y el físico-médico especialista en radiodiagnóstico, tienen las siguientes responsabilidades primordiales:

1. Garantizar la calidad de la imagen diagnóstica.
2. Optimizar la dosis de radiación que impactará al paciente durante el estudio.
3. Verificar la aplicación de las medidas de protección radiológica pertinentes durante el proceso.
4. Aplicar junto con el titular de la instalación un programa de garantía de calidad

En México, este procedimiento está reglamentado por la norma oficial mexicana **NOM-041-SSA2-2011** que establece que el conjunto de personas involucradas en el proceso de adquisición de imágenes mastográficas (personal médico, técnico, administrativo y de servicio) deben observar lo establecido en un programa de garantía de calidad en el servicio de mastografía.¹⁰ La Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), es la responsable de verificar que los gabinetes que cuenten con equipo de rayos X de diagnóstico cumplan con los requisitos técnicos indicados en la **NOM-229-SSA1-2002**, pero a menudo y debido a la falta de personal no es posible realizar este tipo de procedimiento con la frecuencia requerida. Por tales circunstancias el papel que debe tener el físico-médico en un programa de garantía de calidad es de suma importancia y es por tanto necesario asegurar su participación para establecer la mayor calidad de los servicios de mastografía.

A pesar de todas estas medidas el cáncer de mama se diagnostica de forma correcta pero tardía.

Identificación de prácticas de tamizaje de salud de los senos

Frecuencia y fecha del último autoexamen y examen clínico. Hacer constar si estaba en un programa de detección precoz o si se realizaba mastografías periódicas y si el diagnóstico fue en la mastografía de cribado o en el intervalo, anotar entonces la fecha de la última mastografía de cribado.

Ultrasonido

Es un estudio complementario de la mastografía diagnóstica. Permite la diferenciación entre masas quísticas y sólidas, por lo que se ha convertido en la técnica de imagen complementaria y fundamental para el diagnóstico (Figura 1.4). La realización de este estudio con un buen equipo y un ultrasonografista experimentado, aumenta la precisión para localizar lesiones benignas y malignas.³⁹

El ultrasonido (Figura 1.5) es recomendable para pacientes menores de 35 años, embarazadas o que estén lactando y con sospecha de cáncer de mama.^{40, 41} Además, deberá realizarse si existe alguna de las siguientes condiciones:

- Mama densa
- Necesidad de caracterizar un tumor
- Densidad asimétrica
- Paciente con implantes mamarios
- Masa palpable
- Datos clínicos de mastitis o abscesos

- Mirocalcificaciones sospechosas



Figura 1.5: Ultrasonido diagnóstico: Este método diagnóstico permite diferenciar entre tumores sólidos y quistes, no está indicado para fines de tamizaje y detección oportuna de cáncer de mama.

Resonancia Magnética

La resonancia magnética, o IRM, es una tecnología que utiliza imanes y ondas de radio para generar imágenes transversales de alta definición del interior del cuerpo (Figura 1.6). Es una técnica de imagenología con mayor especificidad que la mastografía, sobre todo en mamas densas. Se recomienda, de acuerdo a la Reunión Nacional de expertos del 2008, para:

- ⊙ Estadificación del tumor conforme a las características de multifocalidad, multicentricidad, bilateralidad y evaluación axilar.
- ⊙ Valoración de márgenes después de la escisión de un tumor.
- ⊙ Seguimiento de pacientes con cáncer mamario, con la finalidad de detectar recurrencia local.
- ⊙ Evaluación de la respuesta al tratamiento.
- ⊙ Búsqueda de tumor mamario oculto con metástasis axilares (primario desconocido).

- ⊙ Valoración de la integridad de los implantes mamarios, particularmente en sospecha de ruptura intracapsular u otras complicaciones.
- ⊙ Embarazo y sospecha de cáncer mamario.
- ⊙ Mama densa.
- ⊙ Tamizaje en paciente de alto riesgo.

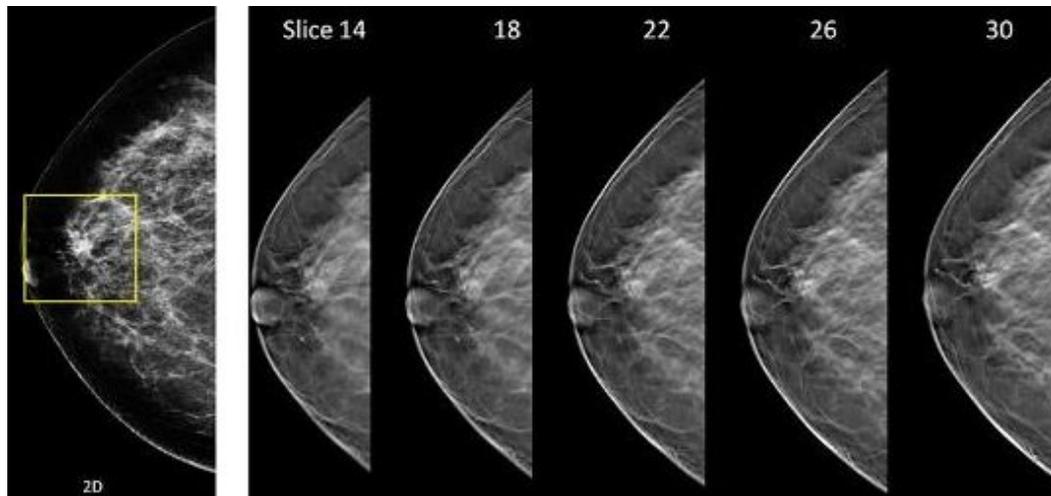


Figura 1.6: Resonancia magnética nuclear diagnóstica: Es un excelente método para la detección oportuna y precoz del cáncer de mama.

Debe realizarse en pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama, ya que define la extensión del cáncer, la presencia de cáncer multicéntrico en mujeres con tejido mamario denso en la mamografía, y para determinar la enfermedad en mujeres con cáncer localmente avanzado.⁴²

La sensibilidad de la RM se encuentra entre 85% y 100% y la especificidad entre 47% y 67%. Este estudio tiene mayor número de falsos negativos en tumores menores de 3 mm, así como en carcinoma *in situ* y en el carcinoma de tipo lobulillar.⁴³

Tomografía

La tomografía es un técnica radiográfica que permite obtener información sobre los órganos internos del cuerpo en cuadros bidimensionales o secciones transversales. La tomografía por emisión de positrones (PET) con [¹⁸F] fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG) es una modalidad diagnóstica valiosa en diversas enfermedades (Figura 1.7), al ser una imagen que combina un estudio de medicina nuclear con tomografía computarizada lo que permite realizar simultáneamente un estudio funcional y morfológico, así como la localización precisa de una lesión.⁴⁴

Se recomienda para realizar la estratificación tumoral, valoración de recurrencias, metástasis, así como para la evaluación de respuesta a tratamientos médicos y para el seguimiento.⁴⁵

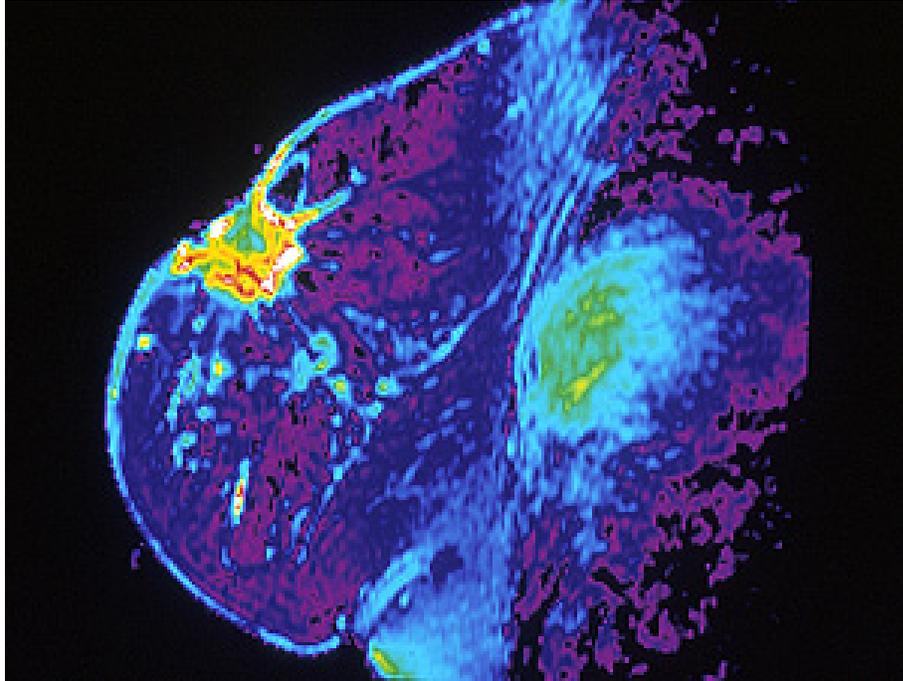


Figura 1.7: Tomografía computarizada: Es un excelente método para la detección oportuna y precoz del cáncer de mama.

Biopsia

Es un procedimiento de investigación clínica que consiste en separar una porción de un órgano determinado para confirmar o completar un diagnóstico. Es necesario realizar una biopsia del tejido sospechoso para determinar la estirpe celular que lo genera, este estudio se debe realizar por personal calificado con el fin de evitar iatrogenias y falsos positivos. Las diferentes técnicas para realizar una biopsia son:⁴⁶

Biopsia por aspiración

Recomendable para lesiones palpables. La técnica implica la introducción de una aguja fina dentro de la lesión y la succión con una jeringa. Lo anterior permite obtener fragmentos pequeños del tumor para estudiarlos histológicamente. La correlación entre diagnóstico citológico e histopatológico es menor al 100%.⁴⁷

Biopsia percutánea con aguja de corte o aspiración por vacío

Emplea una aguja de calibre mayor, algunas veces equipada con un instrumento de corte. Debe obtenerse de una lesión palpable, o bien, bajo la guía de un método de imagen como mastografía y/o ultrasonido, cuando la lesión no es palpable. El resultado se reporta de B1 (benigno) a B5 (células malignas). Si el resultado corresponde a las lesiones potencialmente malignas (B3) o sospechosas de malignidad (B4) se recomienda biopsia escisional.⁴⁸

Biopsia abierta

1. **Incisional:** Se obtiene parte del tejido de una lesión palpable con fines diagnósticos y determinación de marcadores por inmunohistoquímica.
2. **Escisional:** Se extrae completamente la lesión mamaria, palpable o no, sin resección total del tejido de la mama.⁴⁹
 - ✦ **Biopsia escisional guiada por arpón:** Para resección de una lesión mamaria no palpable, detectada en una mastografía, mediante la colocación de un arpón metálico en la zona sospechosa.
 - ✦ **Biopsia escisional sin arpón:** Para resección de una lesión mamaria palpable.

1.1.7 Tratamiento

El tratamiento es multidisciplinario e involucra al cirujano oncólogo, oncólogo clínico, patólogo, radiólogo, radioterapeuta, psico-oncólogo, cirujano plástico y el médico general o familiar.

Los aspectos a considerarse para definir el tratamiento más adecuado se centran en una historia clínica completa con factores de riesgo y antecedentes familiares de cáncer de mama, así como la etapa clínica de la enfermedad y el reporte histopatológico que incluya estudios de inmunohistoquímica para receptores hormonales y determinación de HER2neu.

Quirúrgico

Cirugía conservadora

También conocida como cuadrantectomía, telectomía, resección amplia, tumorectomía o lumpectomía. Su objetivo es la extirpación completa del tumor con un aceptable resultado estético. La resección se realiza dejando márgenes suficientes libres de tumor. En conjunto, debe realizarse el tratamiento quirúrgico de la axila.³⁹

Sin embargo, esta cirugía está contraindicada si existe una lesión multicéntrica (clínica o radiológica), un componente intraductal extenso, tamaño tumoral relativo, localización

central, embarazo, enfermedades de la colágena y/o si no se puede administrar terapia postoperatoria.⁵⁰

Cirugía radical curativa

Conocida también como mastectomía radical modificada, en la cual se extirpa la mama, la aponeurosis del músculo pectoral mayor, el músculo pectoral menor y el contenido axilar. Al contrario de la cirugía conservadora, las indicaciones para realizarla, son las siguientes: consentimiento informado de la mujer, enfermedad multicéntrica, embarazo, enfermedades de la colágena y no poder administrar radioterapia postoperatoria.⁵¹

Tratamiento axilar

La disección axilar contribuye con la información necesaria para definir la etapa clínica del padecimiento e incrementa la supervivencia en un subgrupo pequeño de pacientes. Es importante mencionar que esta disección tiene complicaciones agudas y crónicas, como linfedemas y heridas neuroléxicas que pueden incapacitar temporal o permanentemente a la paciente.⁵²

Ganglio centinela

Se emplea la técnica de mapeo linfático y biopsia de ganglio centinela en tumores menores de 5 cm y con una axila clínicamente negativa. La disección axilar transoperatoria de la axila no es necesaria, hasta contar con el reporte definitivo de patología.⁵³

Cirugía radical paliativa

El objetivo de las intervenciones quirúrgicas, cuando se considera que la neoplasia maligna es incurable, es atenuar las consecuencias de la enfermedad para incrementar la calidad de vida y la supervivencia.⁵⁰

Cirugía reconstructiva

Es parte del manejo multidisciplinario de la paciente. Permite a la mujer tener mejor autopercepción de su imagen corporal, la cual le otorga una mejor calidad de vida y bienestar. Cuando una mujer es sometida a mastectomía radical, el médico debe informar a la mujer sobre esta posibilidad y sobre las diferentes técnicas.⁵¹

Quimioterapia

Corresponde al uso de medicamentos por vía intravenosa que se aplican mediante catéter cuya función es destruir células neoplásicas y detener su división y proliferación. Puede

ser utilizada como neoadyuvante, adyuvante y de manera paliativa.⁵⁴

Quimioterapia neoadyuvante

Indicada antes de un tratamiento radical (cirugía o radioterapia), cuando éste no está indicado o puede ser menos efectivo. Las principales ventajas del tratamiento⁵⁵ son:

- 🍃 Inicio temprano de terapia sistémica
- 🍃 *in vivo* para valorar sensibilidad al tratamiento
- 🍃 Incremento de las posibilidades de cirugía conservadora
- 🍃 Obtención de respuestas patológicas completas con valor pronóstico
- 🍃 Realizar estudios clínicos y valorar estrategias de tratamientos novedosos y específicos

Quimioterapia adyuvante

Se administra después del tratamiento quirúrgico radical. El objetivo de la terapia es incrementar el periodo libre de enfermedad, reducir recurrencias locales y sistémicas e incrementar la supervivencia sin disminuir la calidad de vida. Se recomienda en pacientes que presenten metástasis en los ganglios axilares en la pieza quirúrgica y en aquellas con ganglios negativos y con alto riesgo de recaída.⁵⁵

Se aconseja iniciar el tratamiento entre la segunda y cuarta semana de la intervención quirúrgica. Se requiere de un oncólogo médico para indicar y vigilar el tratamiento, así como de una enfermera especializada. Además, es necesario contar con antieméticos necesarios para disminuir la toxicidad digestiva, así como con factores estimulantes de colonias en caso de neutropenia.⁵⁶

Independientemente del resultado de los receptores hormonales, la quimioterapia es recomendable para pacientes menores de 70 años con indicación de tratamiento adyuvante. En pacientes mayores de 70 años no hay evidencia suficiente del beneficio y cada caso deberá tratarse de forma individualizada, considerando los padecimientos concomitantes y la morbilidad del tratamiento.⁵⁶

Quimioterapia paliativa

Se emplea en mujeres cuyos tumores son metastásicos. Tiene como objetivo mejorar y extender la vida de la paciente, ya que no tiene intención curativa.

Radioterapia

Es el uso de radiación de alta energía de rayos X o gamma, neutrones, protones, y otras fuentes para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radiación puede ser generada por una máquina fuera del cuerpo (radioterapia externa), o bien, puede producirse por material radiactivo colocado en el cuerpo cerca de las células cancerosas (radioterapia interna), la cual puede usar un anticuerpo monoclonal marcado radioactivamente.⁵⁷

Es un complemento indispensable en el manejo conservador del cáncer de mama y se recomienda que todas las pacientes la reciban, a menos que la cirugía radical la vuelva innecesaria. Reduce la tasa de recurrencia local de 26 a 6%.⁵⁸

Radioterapia complementaria

Su finalidad es la disminución de recidivas locorregionales. Se emplea de manera adjunta a la cirugía.⁵⁹

Radioterapia paliativa

Principalmente, se emplea en pacientes con metástasis óseas y cerebrales. Sin embargo, se usa también en los siguientes casos: metástasis a piel y tejidos blandos, lesiones ulceradas, fungantes o sangrantes sin respuesta al manejo médico; en metástasis oculares se han reportado beneficios.⁵⁹

Terapia endócrina u hormonoterapia

Debido a que el cáncer de mama tiene una fuerte relación con las hormonas, la presencia de los receptores hormonales refleja su grado de sensibilidad a las hormonas, permite predecir con cierto grado de confianza la respuesta a la terapia endocrina.

Esta terapia dependerá del periodo en relación con la menopausia, edad de la paciente, tamaño del tumor, grado histológico y determinación de receptores tumorales. Se divide principalmente en:

Terapia endocrina neoadyuvante

En pacientes con receptores hormonales positivos y para quienes requieran un tratamiento inicial sistémico, se recomienda el uso de tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa.⁶⁰

Terapia endocrina adyuvante

Indicado únicamente para pacientes con receptores hormonales positivos, indistintamente de si reciben quimioterapia o no. Sin embargo, para pacientes mayores de 70 años con

receptores hormonales positivos es recomendable administrar hormonoterapia adyuvante como único tratamiento.⁶⁰

Tratamiento con Trastuzamab (Herceptin)

La investigación sobre el manejo del cáncer de mama ha contribuido al incremento en los índices de supervivencia y curación de los pacientes con esta enfermedad. Se ha demostrado por ejemplo, que Docetaxel en combinación con Trastuzamab es superior a Docetaxel solo, como tratamiento de primera línea en pacientes con sobreexpresión de la proteína HER2neu en cáncer metastásico, muestra un incremento en la supervivencia y en la tasa de respuesta, con muy poca toxicidad adicional.⁶¹

1.1.8 Pronóstico

Los factores pronósticos y predictivos necesarios en cáncer de mama son los receptores hormonales para estrógenos (RE) y para progesterona (RP), los cuales pueden estar contenidos en el citoplasma de las células tumorales, y la sobreexpresión de la proteína HER2neu.⁶²

Los tumores RE positivos presentan una tasa de respuesta de 50-60% al tratamiento hormonal, mientras que sólo se obtiene respuesta en el 10% de los RE negativos. Por otro lado, el RP es un marcador de acción estrogénica, por lo tanto es más probable que un tumor positivo a estos dos receptores responda mejor al tratamiento hormonal. De acuerdo a estudios realizados se ha comprobado que los tumores con receptores positivos a hormonas tienen mejor pronóstico a corto plazo, pero a largo plazo la frecuencia de recidivas y la supervivencia de ambos grupos tiende a ser igual.⁶³

Se ha observado la amplificación y sobreexpresión del gen HER2neu en adenocarcinomas de senos y ovarios en los análisis genómicos de tumores primarios. Representa un factor pronóstico independiente y se correlaciona con una supervivencia más corta.⁶⁴

1.1.9 Biología celular del cáncer de mama

Activación de las señales de crecimiento

Las células normales requieren de factores de crecimiento para pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activa. Por el contrario, las células cancerosas presentan un desbalance proliferativo debido a cinco alteraciones:

1. Autoproducción de factores de crecimiento y estimulación autócrina.
2. Sobre-expresión de los receptores de los factores de crecimiento.

3. Alteraciones estructurales de los receptores.
4. Expresión de los receptores de la matriz extracelular (integrinas).
5. Modificaciones en las vías de señalización inducidas por los factores de crecimiento.

Estas alteraciones conllevan al crecimiento anormal del parénquima de la mama, así como también de las diferentes estirpes celulares que la conforman, pudiendo generar desde un fibroma hasta un cáncer de mama triple negativo. Todas las neoplasias de la mama y en general cualquier tipo de cáncer cursa con:

- 🌀 Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento.
- 🌀 Evasión de la apoptosis.
- 🌀 Potencial replicativo ilimitado.
- 🌀 Angiogénesis sostenida.
- 🌀 Metástasis.

1.1.10 Teoría monoclonal molecular

Las células que conducen al cáncer pueden mostrar, en su mayoría, alteraciones en las secuencias del ácido dextrirribonucleico (ADN) que contienen una aberración heredable. En general el cáncer no es causado por un solo evento, sino, es el resultado de varios cambios independientes ocurridos en una célula con efectos acumulativos.⁶⁵

La regulación de la proliferación celular en el organismo incluye dos genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor. Los proto-oncogenes generan proteínas que se expresan en diferentes momentos del ciclo y son imprescindibles para su regulación. Sin embargo, determinados cambios estructurales y/o funcionales en los proto-oncogenes contribuyen a la malignización de la estirpe celular, convirtiéndolos en oncogenes. Estos oncogenes originarán proteínas con expresión/función alterada que favorecerán el crecimiento y/o la invasividad tumoral.⁶⁶

Los oncogenes que sólo precisan tener mutados un alelo, para ejercer su acción promotora y así producir la sobreexpresión de una proteína dada se denominan oncogenes dominantes. En cambio, los genes supresores de tumor que se alteran deben presentar mutación en los dos alelos, de forma que el gen no se exprese de ninguna manera (ya que, con al menos uno de los alelos inalterado podría producir la proteína supresora normal), se denominan oncogenes recesivos.⁶⁷

Las características que presentan las células tumorales,⁶⁸ incluyen:

1. Señales de crecimiento sostenidas.
2. Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento.



Figura 1.8: Características de las células tumorales: Representación esquemática de las inestabilidades genéticas presentes en las células tumorales que les permiten la resistencia.

Fuente: <http://blog.diagnostrum.com/>

3. Evasión de la apoptosis.
4. Potencial de replicación ilimitado.
5. Angiogénesis sostenida.
6. La invasión de tejidos y metástasis.

La modulación del metabolismo y la señalización asociada está implicada cada vez más en la determinación de la identidad de la célula durante la reprogramación nuclear y la oncogénesis. La transformación del metabolismo celular precede a cambios en la programación metabólica lo que se refleja en la dinámica molecular fundamental para el reordenamiento.⁶⁹ Además de células cancerosas, los tumores muestran otra dimensión de complejidad: contienen un repertorio de células reclutadas, aparentemente normales, que contribuyen a la adquisición de los rasgos distintivos de la creación del “microambiente tumoral”.⁶⁶ De esta manera las células deben pasar por una serie de procesos que caracteriza la malignidad de los tumores cancerígenos.

Primero la célula posee la habilidad para sostener su proliferación de manera continua. Esto se puede lograr por diversas vías. Por ejemplo, la señal mitogénica se inactiva por

fosforilación de RB, por lo tanto cuando se altera RB las células son modificadas. O, también TGF que, a través de vías complejas de fosforilación de Rb, detiene así el ciclo de la célula.⁷⁰

La proliferación se da, de manera más rápida en un ambiente con condiciones limitantes, y que de forma común reprimen la proliferación celular normal.⁷¹ Por lo tanto, la selección para la resistencia está asociada con la selección para inestabilidad genética (Figura 1.8).⁷²

1.1.11 Teoría monoclonal celular

Cada cáncer posee características que reflejan su origen; la mayoría deriva de una célula anormal (origen monoclonal) iniciada en un cambio genético.⁷³

En el hombre ocurren 10^{16} divisiones celulares en el curso de la vida en un medio sin mutágenos; aproximadamente suceden 10^6 mutaciones por gen en cada división celular, a pesar de la reparación del ADN. Durante la vida, un solo gen puede experimentar mutaciones en 10^{10} ocasiones; en medio de éstas se pueden afectar los genes involucrados en la regulación de la división celular perdiendo así la restricción normal de la proliferación. Se ha demostrado que es necesario que una célula sufra de 3 a 7 eventos independientes para que suceda una transformación neoplásica.⁷⁴

Cuando se produce una alteración del ADN ocurren 3 posibilidades para la célula:

1. La intervención de los mecanismos de reparación del daño regresan a la célula a la normalidad.
2. La célula puede morir o, puede pasar a ser una célula iniciada en la transformación.
3. Pese a lo anterior, la iniciación como cambio molecular heredable no es un evento suficiente ya que, la proliferación de las células alteradas requiere de otro paso: **la promoción**.⁷⁵

Las alteraciones epigenéticas (por ejemplo, desmetilación o metilación de regiones promotoras de genes o acetilación de proteínas) pueden contribuir a la expresión desregulada de las enzimas clave implicadas en el metabolismo celular. De esta manera, se ha demostrado que la acetilación reversible de las histonas y de proteínas no histonas afectan el metabolismo celular. Por ejemplo, la enzima hexoquinasa (HK2), una limitante de la velocidad de la enzima clave de la gluconeogénesis y la fructosa-1,6-bifosfatasa (FBP1), tienen una función opuesta en la glucólisis, recientemente se ha identificado epigenéticamente que se regulan por desmetilación del promotor y metilación, respectivamente (Figura 1.9). El efecto de los promotores es estimular la división celular en la región previamente expuesta donde un iniciador produjo un crecimiento pequeño a partir de una célula mutada.^{76, 77}

Cada célula pluripotencial genera una célula hija pluripotencial y otra, destinada a diferenciarse, que cesa su división. La fina homeostasia entre la producción y la pérdida

de células distingue a la proliferación normal de la alterada. Unos tumores son más lentos que otros; por ejemplo, en el adenocarcinoma de colon el crecimiento sólo supera la pérdida en un 10%, por ello, es más lento que un linfoma de alto grado de malignidad que puede hacerlo a un 20%.⁷⁸

Dado que entre los descendientes de las células transformadas es fácil identificar subclones que difieren en el cariotipo, expresión de antígenos de membranas, velocidad de crecimiento, capacidad de infiltración, resistencia a antineoplásicos, etcétera, entonces puede considerarse que los tumores son masas heterogéneas a pesar de su origen monoclonal. La desaparición de subclones por la acción del sistema inmune, o de otros factores, origina una selección sobre los subclones y muchos de los que sobreviven logran mejor capacidad para la invasión y la metástasis. La célula tumoral, además, puede estimular el desarrollo de vasos sanguíneos para los nutrientes y el O_2 que necesita.⁷⁹

Las células transformadas son genéticamente inestables y tienen alterados sus mecanismos de reparación. De esta manera, los errores acumulados generan unos u otros fenotipos y la supervivencia de los mismos está determinada por dichos fenotipos: por ejemplo, si se genera un subclón muy antigénico, será destruido por las defensas del huésped; por otra parte, un subclón que no precisase de factores de crecimiento para multiplicarse, es más probable que se perpetúe.⁸⁰

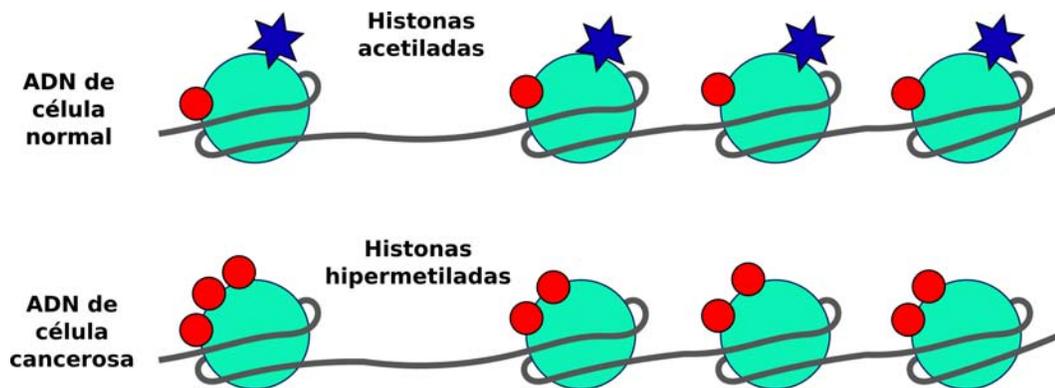


Figura 1.9: Alteraciones epigenéticas: Metilación y acetilación de proteínas que contribuyen a la expresión o silenciamiento de genes.

Fuente: <http://blog.diagnostrum.com/>

Células Tumorales Circulantes

2.1 Definición

Células tumorales que se desprenden del tumor primario desde etapas iniciales de la progresión maligna. De esta manera, las células liberadas invaden capilares viajando por torrente sanguíneo, por lo que se conocen como Células Tumorales Circulantes (CTCs). Al adherirse a las paredes de los capilares y escapar del vaso sanguíneo (extravasación), estas células se establecen en otro órgano diferente al del tumor primario, generando metástasis. Sin embargo, las CTCs, no se establecen en un lugar al azar. Stephen Paget propuso, en 1889 la teoría del suelo y la semilla, misma que sostiene, que ciertas células tumorales (semillas) tienen afinidad para implantarse en las condiciones de un órgano en particular (suelo), y cuando ambas condiciones se dan, se propicia la metástasis.⁸¹

Las CTCs pueden detectarse en la sangre de pacientes con casi todos los tipos adenocarcinomas locales y metastásicos. Las CTCs son células epiteliales cuya liberación de un tumor primario o una localización metastásica puede ocurrir por una transición epitelial-mesenquimal. A menudo se presentan discrepancias con el tumor primario, especialmente en relación con la base molecular de la sensibilidad/resistencia a las terapias dirigidas.⁸²

Anteriormente se creía que las CTCs eran poco frecuentes entre la población de células tumorales primarias, sin embargo se ha informado recientemente que las CTCs representan una enorme población heterogénea de células tumorales.⁸³ Esto pudo corroborarse a través de un estudio donde se analizaron los perfiles de células aisladas de CTCs de un mismo paciente y mostraron una alta heterogeneidad transcripcional.⁸⁴

Al igual que las células tumorales primarias, las CTCs también expresan marcadores epiteliales, tales como molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) o ciertas citoqueratinas (CKs). Sin embargo, durante la transición epitelial mesenquimal (EMT), algunos CTC adquieren fenotipos alterados que pueden estar relacionados con la

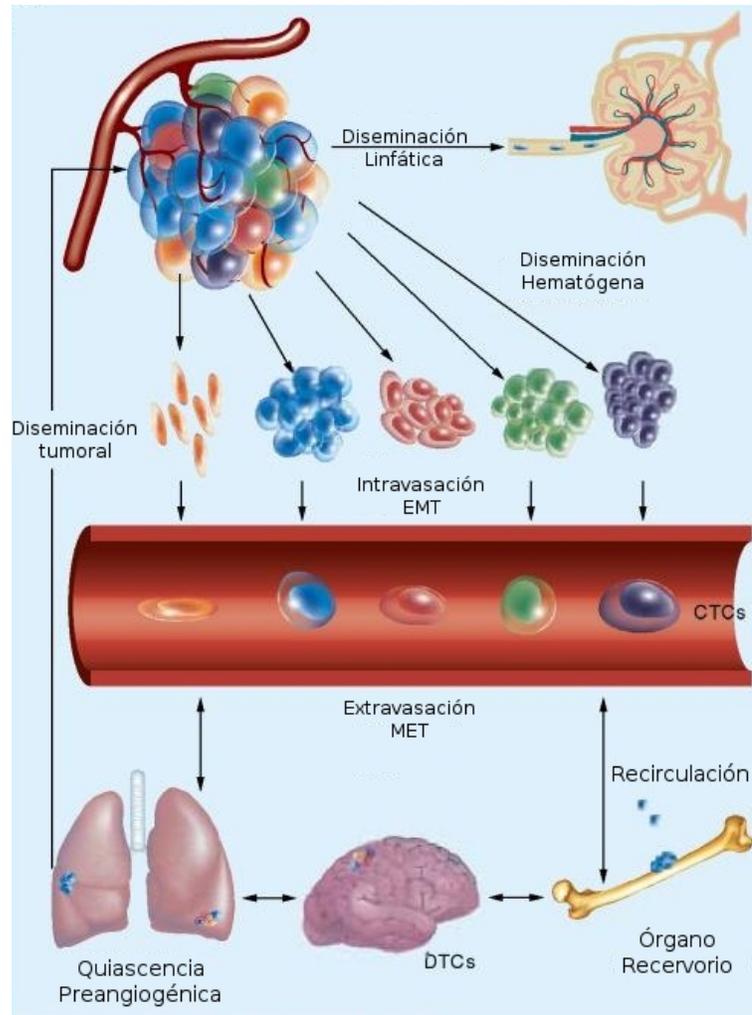


Figura 2.1: Células tumorales circulantes y diseminantes: Esquema que muestra el origen de las células circulantes y diseminantes en el cáncer de mama.

Fuente: Expert Review Molecular Diagnostic (2013).

agresividad tumoral.⁸⁵

2.1.1 Diferenciación

Las características físicas y biológicas de las CTCs permiten distinguirlas de las células normales en sangre periférica. Debido a que la concentración de CTCs en sangre periférica, incluso en pacientes con un proceso metastásico en curso, no supera el índice de 1 CTC por cada 10^5 células leucocitarias, por lo que la mayoría de los sistemas de detección consisten en una fase de enriquecimiento seguida del proceso de detección.⁸⁶

Existen muchos métodos para el análisis de CTCs y están disponibles comercialmente

pero muy pocos evalúan y estandarizan lo necesario para aplicaciones clínicas. El dispositivo CellSearch es el único método validado por la FDA para la detección de cáncer de mama, de próstata y el cáncer colo-rectal. Se ha utilizado en la mayoría de los estudios que han demostrado el valor pronóstico y predictivo de las CTCs en muchas localizaciones tumorales.⁸⁷

Generalmente, los sistemas de detección se categorizan en dos tipos:⁸⁸

- Técnicas basadas en la identificación de ácidos nucleicos (biología molecular).
- Separación de las células tumorales circulantes (citometría).

Con el objetivo de obtener una mejor visión del valor pronóstico de las CTCs en pacientes con cáncer de mama, se realizó un meta-análisis exhaustivo de la literatura publicada sobre este tema, donde se incluyeron los pacientes con enfermedad temprana y avanzada, en el cual se evaluó el valor pronóstico de la condición de CTCs (presencia vs ausencia) en la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia global (SG) en pacientes en estadio temprano (M0), así como en la supervivencia libre de progresión (PFS) y la SG en pacientes metastásicos (M1).⁸⁷ En conclusión, los resultados mostraron un fuerte valor pronóstico de las CTCs en fase inicial y en los pacientes con cáncer de mama metastásico. Así se han realizado estudios para evaluar la detección de CTCs en diferentes momentos: antes y durante la terapia sistémica, y ha servido como una herramienta para guiar el tratamiento en pacientes con cáncer.⁸⁷

2.1.2 Identificación

Los 2 principales enfoques para la detección de CTCs son ICC y RT-PCR. Una de las ventajas de los métodos de ICC sobre los métodos de ácidos nucleicos es la preservación de la célula durante el proceso, lo que permite la caracterización adicional de CTCs por ICC adicional y métodos moleculares. En comparación con ICC, RT-PCR que parece ser más sensible.⁸⁹

Los niveles de CTCs en la sangre tienen valor pronóstico en el cáncer de mama precoz y metastásico. Las CTCs muestran diferentes grados de concordancia con los marcadores moleculares de los tumores primarios a partir de las cuales se originan. Las células individuales reflejan la heterogeneidad y la evolución de las células tumorales a medida que adquieren nuevas funciones y respuestas diferenciales a la quimioterapia. Sin embargo, el grado de similitud también es plausible, destacan las alteraciones que permiten a las células tumorales realizar actividades que las definen, como invasión e intravasación.

Se realizó un estudio donde se evaluaron los perfiles de CTCs de cáncer de mama para identificar cambios ocultos ocurridos durante la progresión metastásica. Identificaron una firma molecular recurrente en las CTCs, que consta de 90 regiones mínimas comunes (MCR) de ganancia. Se encuentran predominantemente en todo el cromosoma 19

y se identificaron a frecuencias bajas (3-4%) en 787 carcinomas de mama primarios examinados.⁹⁰

2.1.3 Valor pronóstico

A pesar de los avances técnicos en la detección de CTCs, la importancia pronóstica de las mismas en cáncer de mama sigue siendo controvertido. De hecho, el marcador tumoral recientemente lanzado por la Sociedad Americana de Directrices de Oncología Clínica declaró que la medición de las CTCs no debe utilizarse para la modificación, diagnóstico o tratamiento en pacientes con cáncer de mama.⁹¹

Algunos investigadores han demostrado que la presencia de CTCs se asocia significativamente con una menor supervivencia en el cáncer de mama (Figura 2.1).⁹² Por ejemplo, el valor pronóstico de la detección de CTCs usando CellSearch se demostró en cáncer de mama metastásico.⁹³ Se han empleado otras formas de evaluar dichas células por ejemplo, evaluando HER2 en el ADN, ARNm y proteínas.⁹⁴

Al existir evidencia de que las CTCs se pueden utilizar como una fuente de tejido para las pruebas de sensibilidad a los fármacos, algunos investigadores han cultivado CTCs *ex vivo*, y han identificado mutaciones activadoras de ESR1 en tres de las seis líneas celulares derivadas de CTCs de pacientes con cáncer de mama ER-positivos pretratados con inhibidor de la aromatasas.⁹⁵ Estas mutaciones rara vez se observan en el cáncer de mama ER-primaria o sin tratamiento previo, pero recientemente se ha observado una frecuencia de 15% en el cáncer de mama resistente a la hormona.^{96, 97}

Del mismo modo, otros grupos han demostrado que las CTCs de pacientes con cáncer de mama⁹⁸ y con cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)⁹⁹ fueron tumorigénicas en modelos de ratón. Además, los derivados de CTCs de modelos de ratón con SCLC demostraron patrones similares de respuesta a la quimioterapia basada en platino como los donantes/pacientes originales.

2.1.4 Valor terapéutico

Como ya se mencionó con anterioridad las decisiones terapéuticas en el cáncer se guían generalmente por biomarcadores moleculares. Sin embargo, como los biomarcadores o genotipos pueden cambiar a medida que surgen nuevas metástasis, las células tumorales (CTC) de la sangre se investigan para entender su papel en la orientación de la selección de medicamentos en tiempo real en circulación durante la progresión de la enfermedad⁹⁶ (Figura 2.2). Sin embargo, la información es limitada con respecto a la heterogeneidad mutacional entre CTCs y metástasis en el cáncer de mama .

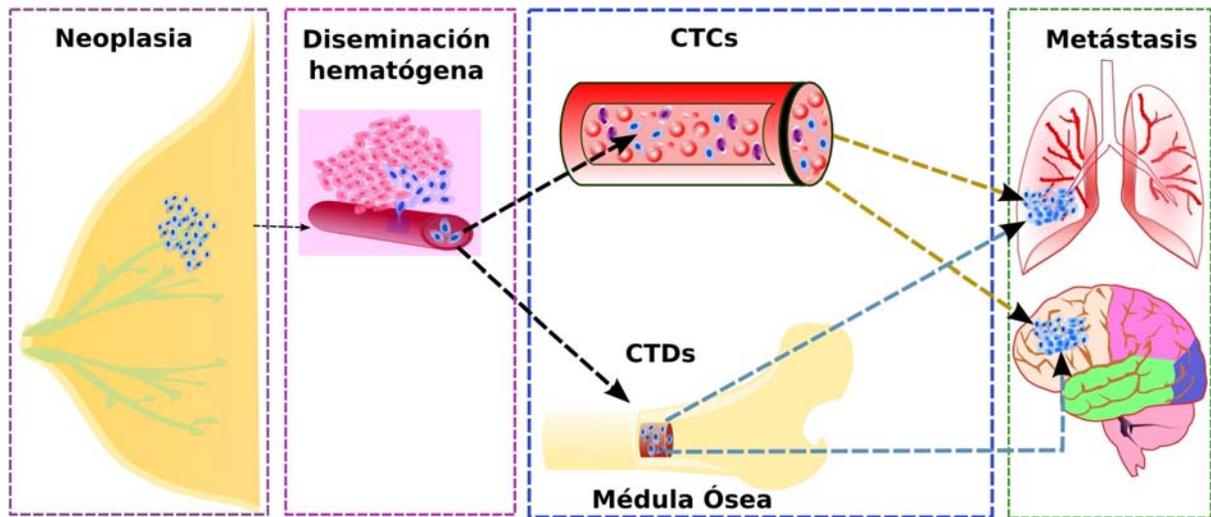


Figura 2.2: Historia natural del cáncer de mama. La imagen muestra la evolución natural del cáncer metastásico de mama, que en su estadio incipiente se encuentra localizado en la mama, sin embargo desde ésta etapa se produce la diseminación hematogena de células tumorales que pueden tomar dos caminos , **A)** Células tumorales diseminantes (DTCs) las cuales se alojan en la médula ósea y posteriormente se reproducen y diseminan a otros tejidos causando metástasis, **B)** Células Tumorales Circulantes que se desprenden del tumor primario y originan metástasis de forma directa, **C)** Metástasis es el resultado de la implantación de las DTCs o CTCs en el parénquima de un tejido específico.⁸¹

Células tumorales diseminantes

Además de las células tumorales circulantes, las células tumorales diseminantes (DTCs) en la médula ósea (BM) pueden ser consideradas una “biopsia líquida” para obtener información útil y dirigir terapias personalizadas para las pacientes. Por otra parte, la caracterización molecular de las DTCs puede proporcionar información importante sobre la biología de la metástasis del cáncer. La médula ósea es un sitio frecuente de metástasis en cáncer de mama, de próstata y cáncer de pulmón, y podría representar un sitio de alojamiento para DTCs derivadas de diversos tipos de tumores epiteliales.

En los últimos años los métodos inmunocitológicos y moleculares altamente sensibles y específicos permiten la detección de las DTCs en médula ósea de pacientes con cáncer a nivel de una sola célula, es decir, antes de la aparición de metástasis. Esta información podría ser útil para evaluar el pronóstico individual y además permitiría estratificar a los pacientes en riesgo de terapias de adyuvancia sistémica contra el cáncer. Aunque la mayoría de los datos sobre el valor pronóstico de las DTCs se encuentran disponibles para el cáncer de mama, varios estudios donde se incluyeron pacientes con cáncer de colon, pulmón, próstata, esófago, estómago, páncreas, ovario y carcinomas de cabeza y cuello han permitido documentar una asociación entre la presencia de DTCs en la cirugía primaria y posterior recaída metastásica. La mayoría de las DTCs se encuentran en un estado latente (es decir, no proliferativa) y con frecuencia expresan HER2.¹⁰⁰

3.0.5 Valor pronóstico

Las DTCs detectadas en la médula ósea son un factor pronóstico independiente para las mujeres con cáncer de mama (Figura 3.1). La secuenciación de células individuales ha abierto la posibilidad de diseccionar el contenido genético de subclonas de un tumor primario así como de las DTCs. Estudios anteriores donde se han estudiado los cambios genéticos en las DTCs han empleado una sola célula matriz de hibridación genómica comparativa que ofrece información sobre las aberraciones más grandes. Hasta la fecha,

la secuenciación de última generación ofrece la posibilidad de descubrir nuevos y más pequeños cambios genéticos neutros y copiarlos. En un estudio se realizó la amplificación de todo el genoma y posteriormente, a través de secuenciación de última generación para analizar dichas células de dos pacientes con cáncer de mama, se compararon los perfiles de número de copias de las DTCs y del tumor primario correspondiente generadas a partir de la secuenciación y datos de hibridación genómica comparada mediante SNPs. Mientras que, un tumor reveló en su mayoría, las pérdidas y ganancias de todo el brazo, el otro tuvo alteraciones más complejas. Se observaron las mismas características en el tumor primario que las correspondientes DTCs. Ambos tumores primarios mostraron amplificación del cromosoma 1q y delección de regiones del cromosoma 16q, que fue recapturado en las DTC correspondientes. Curiosamente, también se observaron diferencias claras, lo que indica que las DTCs se sometieron a una mayor evolución en el nivel de número de copias. Los análisis permitieron comprender la difusión de células tumorales y mostraron la evolución del número de copias en DTCs en comparación con los tumores primarios.¹⁰¹

3.0.6 Valor diagnóstico

Aún no existen suficientes estudios enfocados al diagnóstico de cáncer de mama, empleando DTCs, sin embargo, la evidencia de las células diseminantes persistentes en la médula ósea de pacientes con carcinoma de mama indica un aumento en el riesgo de recurrencia posterior.¹⁰²

Un estudio encontró correlación positiva entre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fenotipo más agresivo de DTC. Esto ha llevado a la adopción generalizada de la terapéutica anti-VEGF en la configuración de ensayos preclínicos y clínicos.¹⁰³

3.0.7 Valor terapéutico

El análisis de células individuales de las CTCs puede revelar que la heterogeneidad genotípica puede cambiar con el tiempo, y mostrar discordancia mutacional relacionada con DTCs y metástasis a distancia. Un grupo de investigadores presentaron un caso que sugiere que las CTCs no siempre reflejan el espectro de mutaciones en la enfermedad metastásica, o que las células mutantes en la circulación pueden ser susceptibles de la administración de la terapia sistémica. Así, se ha postulado que la médula ósea al ser un sitio más privilegiado y quizás quimio-refractario que el torrente sanguíneo, permite que el análisis de las CTCs y DTCs puedan proporcionar información clínica independiente potencialmente relevante para las decisiones de tratamiento.¹⁰⁴

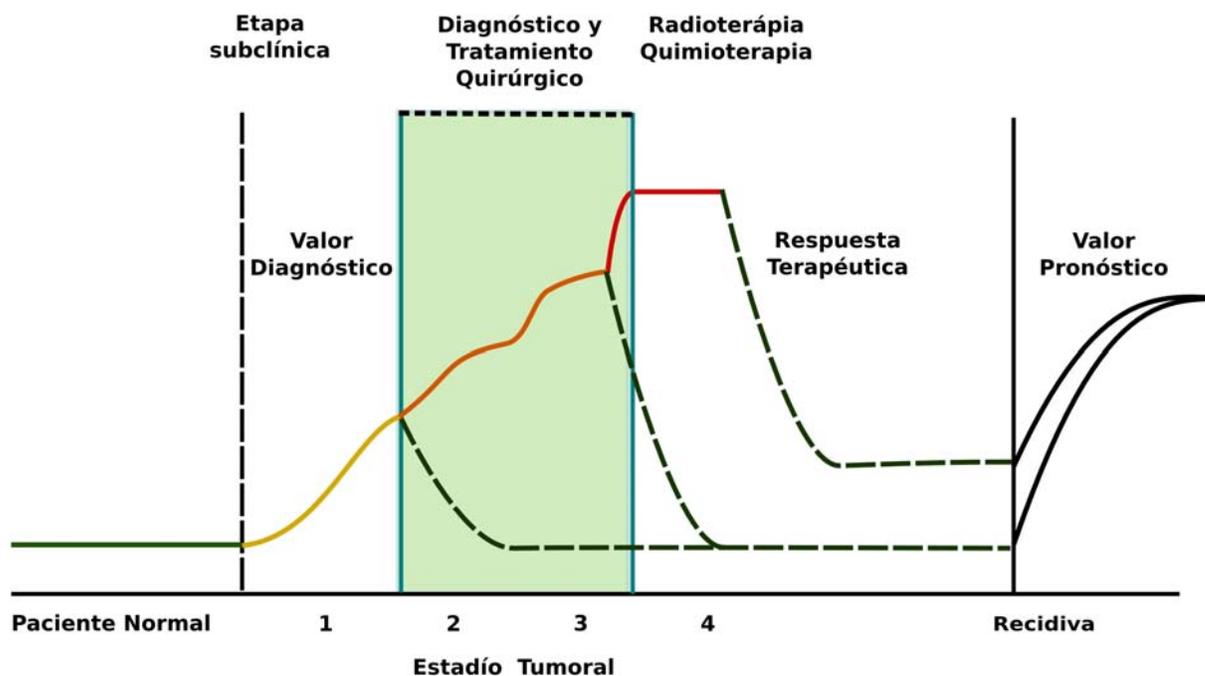


Figura 3.1: Curso temporal de las células tumorales circulantes y valor clínico. La imagen muestra la evolución natural de las CTCs desde los estadios tempranos del cáncer de mama hasta los estadios tardíos. En los países en vías de desarrollo el diagnóstico del cáncer de mama se realiza en estadios 2 y 3, los cuales se caracterizan por una alta concentración tanto de células tumorales circulantes como de células tumorales diseminantes.⁸¹

Marcadores Moleculares

4.1 CK-17

Las citoqueratinas son proteínas que forman parte del grupo de los filamentos intermedios con función en la integridad estructural de las células epiteliales que revisten las superficies.

Las citoqueratinas (CK) 5/6 y 17, son marcadores mioepiteliales, pero se expresan en una proporción igual o mayor en carcinomas de mama. Estudios de expresión génica han demostrado que los tumores *basal/like* (BLBC) se asocian con la expresión de citoqueratinas de tipo basal. Si bien, los patrones fenotípicos de expresión de citoqueratina basal en BLBC no se han estudiado ampliamente, un grupo de investigadores analizó una serie de 995 tumores de mama invasivos bien caracterizados, para cuatro citoqueratinas basales (CK5, CK5/6, CK14 y CK17). Como resultado, tal como se define BLBC por la negatividad para ER y HER2, mostraron positividad variable para expresión de citoqueratinas basales: 61,7% CK5, el 50,5% CK5/6, el 24,2% y el 23% para CK14 y CK17, respectivamente. Se identificaron cuatro grupos con diferentes patrones de expresión de citoqueratina basal: (1) la negatividad para todas las citoqueratinas basales, (2) CK5 (+) / CK17 (-), (3) CK5 (-) / CK17 (+) y (4) CK5 (+) / CK17 (+). Estos patrones de expresión de citoqueratina basal se han asociado con diferencias en la evolución del paciente, los grupos 1 y 3 mostraron mejores resultados que el grupo 4 y 2, el grupo 2 que fue el de peor pronóstico.¹⁰⁵

Previamente se determinó la incidencia de la expresión basal de citoqueratinas CK5/6 y CK17 en las muestras ensayadas de los cánceres de mama ductal invasivo, así como para probar la presencia de una correlación de la expresión tumoral de citoqueratinas y factores pronósticos basales clinicopatológicos, empleando inmunohistoquímica (IHC). EL 22% y 30% fueron positivas para CK5/6 y CK17, respectivamente, y mostraron relación inversa significativa con los receptores de estrógenos, progesterona y HER2.¹⁰⁶

Estudios recientes han demostrado que el BRCA1 funcional reprime la expresión de citoqueratinas 5 y 17, y p-cadherina (CDH3). Los ensayos en Chip demuestran que el

BRCA1 recluta a los promotores de KRT5, KRT17 y CDH3.¹⁰⁷

Las características morfológicas asociadas con la estructura BLBC muestran un patrón de crecimiento difuso, grandes áreas de cicatrización sin células en el tumor, necrosis geográfica empujando el margen de invasión, infiltrado linfocitario en diversos grados en el estroma del tumor, las células tumorales sincitiales sin límites claros, células tumorales mostrando la cromatina vesicular clara y nucléolo así como el recuento mitótico marcadamente elevado.¹⁰⁸

4.2 MAM- α

La mamaglobina humana es un miembro de la familia de proteínas uteroglobina que recientemente se ha demostrado es un marcador específico de cáncer de mama. Mientras que los niveles bajos se pueden detectar en el tejido normal de mama, la expresión se incrementa dramáticamente en este tipo de cáncer. La detección en sangre y fluidos corporales también se correlaciona con la metástasis del cáncer, y sus niveles con el pronóstico. Al ser secretada fácilmente a partir de los tumores de mama y provocar la producción de autoanticuerpos detectables en el suero de pacientes con cáncer de mama, promete ser un marcador molecular útil para la detección precoz del cáncer de mama, especialmente en individuos de alto riesgo.¹⁰⁹ La mamaglobina también se ha utilizado para la focalización inmunoterapéutica de las células de cáncer de mama. Sin embargo, existen algunas controversias en cuanto a su eficacia diagnóstica y el valor pronóstico.¹¹⁰

Por medio de Northern blot y RT-PCR se ha demostrado que la expresión de mamaglobina se limita a la glándula mamaria y que su mRNA es altamente detectable en líneas celulares de tumores de mama humanos y tumores primarios de mama en comparación con tejidos de mama no malignos.¹¹¹ Se ha observado, además, que su expresión no aumenta la tasa de crecimiento de líneas celulares, lo que indica que no es probable que participen en la división celular.¹¹²

Por otra parte, el núcleo hidrófobo es capaz de unirse a moléculas similares a los esteroides, lo que sugiere la existencia de un transporte o la activación de la función hormonal.¹¹³ El análisis de más de 300 tumores reveló que MAM- α se expresa simultáneamente con lipofilina.¹¹⁴

De acuerdo al conjunto de marcadores moleculares empleados, la utilidad de mamaglobina como marcador puede aumentar, como se demostró en un estudio donde se probó con el CEA y CA-15.3 simultáneamente, y su sensibilidad se incrementó de 54% a aproximadamente 90%, lo que sugiere la eficiencia de mRNA de mamaglobina en complemento con dichos marcadores.¹¹⁵

Se ha demostrado que mamaglobina junto con survivina y la telomerasa humana transcriptasa (hTERT) se correlaciona con afectación ganglionar linfática.¹¹⁶

Otros grupos de investigadores realizaron pruebas paralelas de los marcadores CEA,

CK-19, HER-2, MAM- α , MAGEA3 (familia antígeno de melanoma A, 3), homólogo TWIST 1 (Drosophila)] (TWIST-1) y sintasa hidroximetilbilano (bancos de leche materna) y observaron un aumento de la sensibilidad para la detección de CTCs con mayores tasas de detección que se encuentran en los casos con metástasis.¹¹⁷ Se han encontrado también correlaciones de MAM- α con Ki67, en el estado del RE y otros factores clínico-patológicos para aumentar la detección y la eficiencia del diagnóstico.^{118, 119}

También se ha detectado asociación entre la expresión de MAM- α con los subtipos moleculares de carcinoma de mama tipo basal (BLC) y carcinoma triple negativo sin clasificar (UTNC). Estos mismos marcadores pueden ser útiles en la detección de recurrencias y metástasis distantes de tumores de mama, incluyendo la detección en líquido pleural¹²⁰⁻¹²²

Del mismo modo, una combinación de marcadores, que incluía mamaglobina, donde la detección se realizó por inmunohistoquímica (IHC) aumentó la sensibilidad y especificidad en la distinción entre las metástasis cutáneas de carcinomas de mama (CMBCs) y carcinomas de las glándulas sudoríparas (sGCs).¹²³

Además se empleó este gen para la elaboración de una vacuna para cáncer de mama. Se realizó la fase I del ensayo clínico de una vacuna MAM-A de ADN para evaluar su eficacia y seguridad biológica, donde catorce personas fueron tratados con la MAM-A de ADN y no se observaron efectos adversos significativos. Se observó, además que la vacuna MAM-A de ADN es segura y capaz de provocar respuesta de células CD8 específicas. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales para definir el potencial de la vacuna MAM-A de ADN para la prevención y/o tratamiento del cáncer de mama.¹²⁴

4.3 HER-2

El receptor de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está compuesta por cuatro receptores diferentes: EGFR (ErbB1/HER-1), ErbB2 (HER-2/neu), ErbB3 (HER-3) y ErbB4 (HER-4).¹²⁵ Estos receptores de membrana tienen un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. Después de la unión de sus ligandos, los receptores ErbB se activan mediante dimerización que puede ocurrir entre receptores idénticos o diferentes, en un proceso llamado homo y hetero-dimerización, respectivamente. Tras la dimerización, múltiples residuos de tirosina situados en los receptores de membrana se fosforilan, y conducen a la activación de las vías de señalización.¹²⁶

La activación del EGFR se ha relacionado con la regulación de los procesos clave implicados en el crecimiento tumoral, la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la motilidad y la migración. Los sustratos intracelulares múltiples participan en las vías esenciales tales como Ras, Raf, Proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) y PI3K/AKT¹²⁷

Para entender el papel de HER-2 en el cáncer de mama, es importante destacar que

este es un receptor-ligando libre. HER-2 siempre está presente en una configuración activa y preparado para dimerizar con cualquier otro miembro de la familia. En las células de cáncer de mama, HER-2 y EGFR están frecuentemente sobre-expresados y confieren un comportamiento agresivo del tumor y, en consecuencia, el aumento de la mortalidad en esta población. Se han reportado variaciones alélicas en las posiciones de aminoácidos 654 y 655 de la isoforma a (posiciones 624 y 625 de la isoforma b), en el alelo más común, Ile654/Ile655. La amplificación y/o la sobreexpresión de este gen se ha descrito en numerosos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y en tumores de ovario. Lo anterior es resultado de splicing alternativo y genera variantes adicionales de transcripción, algunos de codificación para diferentes isoformas y otros que no se han caracterizado completamente.¹²⁸

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, y dentro del subtipo positivo HER-2 está altamente ejemplificado por la presencia de heterogeneidad fenotípica y clínica sustancial, principalmente relacionados con la expresión del receptor hormonal (HR). La positividad de HER-2 se asocia comúnmente con un fenotipo tumoral más agresivo y la disminución de la supervivencia global y, por otra parte, con un beneficio reducido de tratamiento endocrino. Los estudios preclínicos corroboran el papel desempeñado por *crossstalks* funcionales entre HER-2 y el receptor de estrógenos (ER) y la señalización de la resistencia endocrina y, más recientemente la activación de la señalización de ER se perfila como un posible mecanismo de resistencia a agentes de bloqueo a HER-2. De hecho, la heterogeneidad de HER-2 en cáncer de mama ha sugerido la base de la variabilidad en la respuesta no sólo a los tratamientos endocrinos, sino también para agentes de bloqueo HER-2. Entre los tumores HER-2 positivos, la expresión de HR define subtipos distintos, con comportamiento clínico diferente y diferente sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos.¹²⁹

De acuerdo a un estudio realizado, la sobreexpresión del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR), resulta en aumento de la fosforilación de ER, incluso en ausencia de su ligando natural, lo anterior se ha asociado con la resistencia a tamoxifeno *in vitro*.^{130, 131}

Un grupo de investigadores, por otra parte, observó que al incluir un tratamiento endocrino se generaba sensibilidad del tumor cuando existía sobreexpresión de HER-2 en modelos de xenoinjertos.^{131, 132}

En los últimos años, varios ensayos clínicos se han centrado en la asociación de vías de bloqueo y expresión de EGFR/HER-2 y HR en pacientes con cáncer de mama.¹³³

Tabla 4.1: Genes de diagnóstico molecular empleados para identificar a los sujetos de estudio positivos a cáncer de mama en etapa subclínica.

<i>Gen</i>	<i>CK17</i>	<i>MAM-α</i>	<i>HER2</i>	
			<i>Variante 1</i>	<i>Variante 2</i>
NCBI	NM_000422.2	NM_002411.3	NM_004448.2	NM_001005862.1
Sinónimos	Keratin, type 1	Secretoglobin	CD340	CD340
	Cytoskeletal 17	Mammaglobin 1	ERBB2	ERBB2
			HER-2/neu	HER-2/neu
			MLN 19	MLN 19
			NEU: NGL	NEU: NGL
			TKR1	TKR1
Cromosoma	17q21.2	11q13	17q12	17q12
Tamaño (DNA)	12191 bp	5564 bp	47523 bp	47523 bp
Tamaño (RNA)	1574 bp	1943 bp	4624 bp	4816 bp
Exones	8	3	16	30

Nota: Estos genes ya han sido analizados en poblaciones de CTCs aisladas de pacientes con cáncer de mama.

Preferencia metastásica

Las dos principales causas de muerte por cáncer son las metástasis y el tromboembolismo venoso (TEV).¹³⁴ Sin embargo, incluso mediante las tecnologías de imágenes de alta resolución disponibles en la actualidad, la micrometástasis es difícil de detectar. Así, en los últimos años se ha trabajado mucho en la detección y caracterización de DTCs y las CTCs. A través de un análisis de 4,703 pacientes, se reportó que la presencia de DTCs en pacientes con cáncer de mama es un predictor independiente de mal pronóstico. Sin embargo, el muestreo de la médula ósea es un procedimiento que no es aceptado fácilmente en el manejo del cáncer de mama, debido a su poder invasivo. Así, el esfuerzo se ha desplazado a la detección de CTCs en sangre periférica.¹³⁵

Algunas propiedades que son ventajosas para los tumores primarios también facilitan incidentalmente el proceso de metástasis. Los tumores requieren de una alta vascularización, pero esto también aumenta las oportunidades para que las células dejen el tumor y viajen por el torrente circulatorio a todo el cuerpo. Los tumores primarios necesitan ser invasivos para así proporcionar espacio para el crecimiento, pero la disminución de la adhesión celular y el aumento de capacidad de alterar los tejidos también ayudan en la implantación de las células metastásicas. Por otra parte, existen funciones que no son importantes para los tumores primarios, pero son necesarias para permitir que una célula tumoral recién implantada establezca una colonia en un tejido distante. Mientras que las CTCs se han implicado en la metástasis, nuevas evidencias han revelado que los agregados de CTCs pudiesen ser un modo de metástasis.¹³⁶ Además, existe evidencia de que la agregación homotípica CTCs se producen en sitios de unión endotelial.¹³⁷

Las características moleculares para que las CTCs conformen metástasis de forma específica radica en el fenotipo del proteoma expresado (Figura 5.1) y de hecho también la preferencia que los tumores tienen para ciertos órganos específicos, por ejemplo: los carcinomas de mama tienen como preferencias metastásica al hueso, pulmón y cerebro.¹³⁸

La identidad y la hora de inicio de los cambios que dotan a las células tumorales con

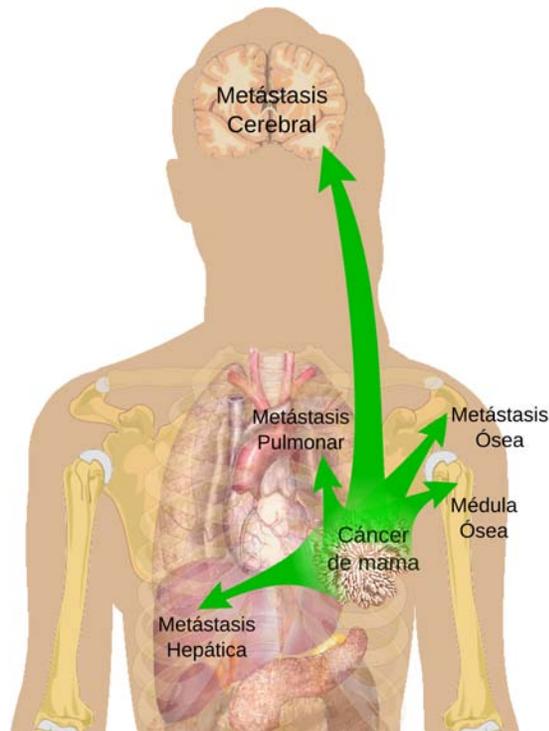


Figura 5.1: Sitios de preferencias metastásicas del cáncer de mama: La preferencia metastásica está dada por el patrón de expresión proteico, el cual le permite a la célula displásica sobrevivir, invadir y desarrollarse en el parénquima de preferencia.

estas funciones metastásicas son en gran parte desconocidos y son un tema de debate.

Se cree que la inestabilidad genómica produce heterogeneidad celular a gran escala dentro de las poblaciones tumorales, de las cuales surgen variantes celulares raras con capacidad invasiva y metastásica aumentada lo que permite que evolucionen mediante un proceso de selección darwiniana.¹³⁹

En trabajos sobre metástasis experimental realizadas con líneas celulares de origen tumoral se ha demostrado que su inyección induce enriquecimiento en el fenotipo metastásico,¹⁴⁰ pero recientemente se ha demostrado que la expresión de genes en variantes celulares raras que median la metástasis de forma específica es irrelevante.¹⁴¹

Mediante perfiles transcriptómicos de carcinomas primarios humanos se han identificado patrones de expresión de genes que, cuando están presentes en la población tumoral primaria, predicen un mal pronóstico para los pacientes. La existencia de estas firmas se han interpretado en el sentido de que las lesiones genéticas adquiridas a principios de la oncogénesis son suficientes para el proceso metastásico. Sin embargo, no está claro si la expresión de estos genes predicen la recurrencia metastásica y si también son mediadores funcionales.¹⁴²

La metástasis depende de una serie de factores como: intravasación tumor celular,

supervivencia en circulación, extravasación en un órgano distante, angiogénesis y crecimiento sin inhibiciones.¹⁴³

Antes del año 2000, los mecanismos subyacentes a la invasión y metástasis en gran medida fueron un enigma. Estaba claro que siendo carcinomas derivados de tejidos epiteliales progresaron a grados más altos de patología y malignidad, lo cual se refleja en la capacidad de invasión local y metastastásica, las células de cáncer típicamente se han asociado con el desarrollo de alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular (ECM). La alteración molecular mejor caracterizada en las células de cáncer de mama, es la pérdida en la expresión de E-caderina, una molécula clave en la adhesión celular. La E-Caderina conforma las uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, y ayuda a ensamblar láminas de células epiteliales y a mantener la quiescencia de las células dentro de estas láminas. El aumento de expresión de E-cadherina se considera como un antagonista de la invasión y metástasis, mientras que no se conoce, si la reducción de su expresión participa como potenciador de estos fenotipos.^{144, 145}

Por otro lado, la evidencia surgida recientemente indica que las células pueden difundir de manera temprana, dispersándose a partir de lesiones premalignas no invasivas tanto en ratones como en seres humanos.¹⁴⁶ Además, las micrometástasis pueden ser generadas a partir de tumores primarios que no son invasivos, pero poseen una neovascularización carente de integridad en el lumen.¹⁴⁷

En trabajos realizados con macrófagos de la periferia del tumor, se demostró que pueden fomentar la invasión local, mediante el suministro de enzimas que degradan la matriz extracelular tales como: metaloproteinasas y proteasas de cisteína-catepsinas.¹⁴⁸

La degradación proteolítica de la matriz extracelular es una actividad crucial presente en las células invasoras. La participación de las enzimas de degradación de la matriz extracelular que se encuentran asociadas al proceso de invasión no se limita a la escisión de proteínas, ya que también implica la degradación de los glicosaminoglicanos. Para salir del lecho tumoral en el epitelio, las células cancerosas necesitan penetrar la membrana basal, para ello utilizan a las MMPs que degradan el colágeno de tipo IV y otros elementos de esta matriz. La expresión de las proteinasas que participan en invasión es sensible a múltiples señales. La interacción con inhibidores naturales, tales como inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) y activador del plasminógeno, son otro nivel en el que se regulan las actividades de proteinasas. Estos inhibidores son regulados por el cambio de una forma inactiva a una forma activa. Muchas proteinasas que participan en la invasión son secretadas por las células del estroma y encuentran su receptor en las células cancerosas, por ejemplo “Estromelina-3” (MMP-11) en el cáncer de mama.

La focalización de los invadopodios es otra manera de regular la actividad metastásica de las células cancerígenas. Sin embargo, no existe evidencia de que las MMPs puedan favorecer su supervivencia en el entorno estromal.^{149, 150}

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas que controlan la migración celular entre

los tejidos, así como el posicionamiento y las interacciones de las células dentro del parénquima. Las quimiocinas conforman una superfamilia de aproximadamente 50 ligandos endógenos. Las quimiocinas median la respuesta del huésped al cáncer dirigiendo el tráfico de leucocitos en el microambiente tumoral. Esta respuesta migratoria es compleja y consta de diversos subconjuntos de leucocitos. Aunque las quimiocinas se identificaron inicialmente como mediadores importantes de la migración de células inmunes, en la actualidad sabemos que también juegan un papel importante en la progresión tumoral. Las quimiocinas pueden modular directamente el crecimiento de tumores mediante la inducción de la proliferación de células cancerosas y la prevención de la apoptosis. Las quimiocinas también pueden modular indirectamente el crecimiento del tumor a través de sus efectos sobre las células estromales del tumor y mediante la inducción de la liberación de factores de crecimiento y factores angiogénicos a partir de células en el microambiente tumoral¹⁵¹ (Figura 5.2)

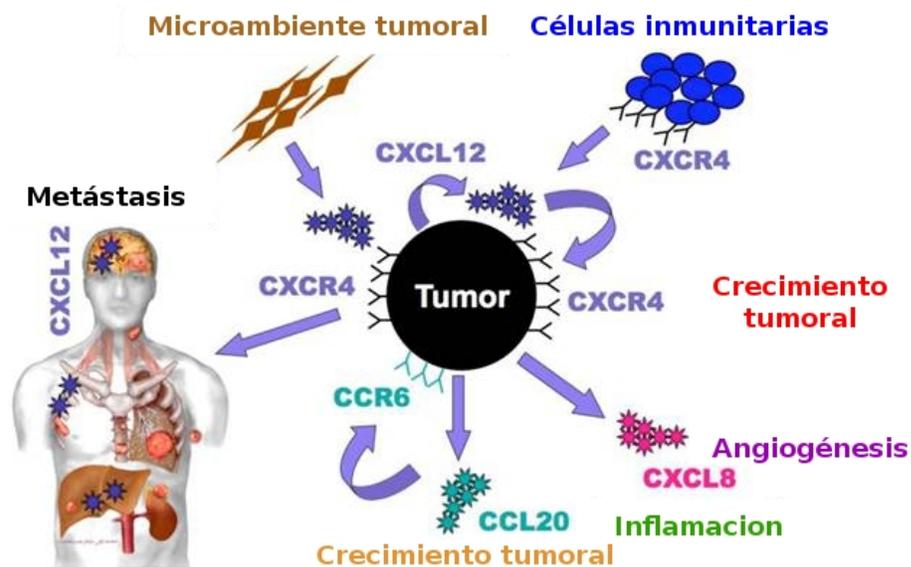


Figura 5.2: Quimiocinas y Metástasis: Representación esquemática de los eventos fisiopatológicos inducidos por citocinas durante el proceso de metástasis.

TFF1 (trefoil factor 1), es un gen regulado por estrógenos y es un marcador de la regulación de genes de estrógenos por estrógenos ambientales. También se regula por otros factores tales como: la hormona de crecimiento (hGH), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y diversos estímulos oncogénicos. Este gen codifica para proteínas secretadas y presentes en el suero, además poseen el potencial de actuar como factores de crecimiento que promueven la supervivencia celular, el crecimiento y la motilidad de anclaje independiente. La evidencia muestra un papel fundamental de estas proteínas en la transformación oncogénica, el crecimiento y la

extensión metastásica de los tumores sólidos.¹⁵²

La aparición de cáncer a menudo se asocia con una disfunción en una de las tres centrales de involución de la membrana (procesos de autofagia, endocitosis o la citocinesis). Curiosamente, las tres vías se regulan por el mismo módulo de señalización central: la clase III fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K-III) y su producto catalítico, el fosfatidilinositol, fosfatidil inositol 3 fosfato (PtdIns3P). La actividad de la subunidad catalítica del complejo PI3K-III, la Vps34 lípido-quinasa, requiere la presencia del factor de VPS15 membrana de focalización, así como la proteína adaptadora Beclin, además de una lista creciente de proteínas reguladoras asociadas con Vps34 a través Beclin 1. Estos factores definen composiciones de subunidades distintas y con ello orientan el complejo PI3K-III a sus diferentes funciones celulares y fisiológicas.¹⁵³

Capítulo 6

Justificación

En México se realizan en promedio 1,000,000 hemotransfusiones al año, en las que se utilizan paquetes globulares etiquetados como sangre microbiológicamente segura, es decir, que han resultado negativos a las pruebas de determinación de: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B y C, (HBV y HCV), sífilis, virus del dengue (*dengue-1*, *dengue-2*, *dengue-3*) y *dengue-4*), Citomegalovirus (CMV), virus del papiloma humano (VPH), *Trypanosoma cruzi* (Chagas), *Brucella abortus* (Brucelosis), *Plasmodium falciparum*, *knowlesi*, *vivax* e *yoelli* (Malaria o paludismo), recalando sangre microbiológicamente segura de acorde a la norma oficial mexicana actual, sin embargo, existen elementos celulares circulantes que no son tomados en cuenta en la evaluación de la bioseguridad de dichos paquetes globulares, tal es el caso de las células tumorales circulantes, que podrían ser transfundidas inconscientemente a pacientes que por diversos motivos tienen la necesidad de hemoterapia, sin que el personal de banco de sangre, el médico tratante y el mismo paciente sospechen del riesgo que esto conlleva, tal es el caso de las células tumorales circulantes de cáncer de mama, que se encuentran en circulación periférica desde periodos subclínicos de la enfermedad, esto es particularmente grave si se trata de mujeres que son catalogadas como clínicamente sanas y aptas para la donación de sangre, debido a que a las unidades de paquete globular que son transfundidas se les realizan pruebas cruzadas de compatibilidad, se aumenta la posibilidad de que las células tumorales tengan un ambiente propicio para su implante y proliferación en las pacientes receptoras. Existen reportes en los que se han detectado pacientes con cáncer metastásico de mama en los que no se puede determinar el origen primario del tumor en la mama de la paciente, en la actualidad dichos estudios de patología se consideran como errores de diagnóstico histopatológico, sin embargo las pacientes evolucionan a estadios terminales y mueren sin saber porque tienen metástasis de cáncer de mama si no tienen tumor primario, existe la posibilidad de que el tumor primario provenga de otra paciente que le haya donado sangre cuando se encontraba en etapa subclínica, en apoyo a esta aseveración, en el Hospital Regional “1º de Octubre” durante el año 2010 se realizaron estudios de

tamizaje en 1833 mujeres clínicamente sanas encontrándose un 6.5% de derechohabientes positivas para cáncer de mama, lo que nos hace suponer que en la población abierta que se recibe como donadoras de sangre, el porcentaje de mujeres positivas a células tumorales circulantes podría ser mucho mayor, por lo tanto es imperativo contar con un sistema de detección temprano de células tumorales circulantes, que permita realizar el diagnóstico temprano del cáncer de mama y que determine las preferencias metastásicas del tumor primario, con la finalidad de establecer una terapéutica curativa, cuando la paciente se encuentra en etapa subclínica.

Objetivos

7.1 Objetivo General

Establecer el estudio molecular de PCR en tiempo real como un método diagnóstico y de preferencias metastásicas de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas.

7.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la frecuencia de mujeres clínicamente sanas que son positivas a Citoqueratina 17 (CK-17).
2. Determinar la frecuencia de mujeres clínicamente sanas que son positivas a Mamaglobina α .
3. Determinar la frecuencia de mujeres clínicamente sanas que son positivas a HER2.
4. Determinar el perfil transcripcional de las muestras positivas para CK-17, Mamaglobina α y HER2.
5. Determinar el patrón transcripcional característico de preferencia metastásica de las células tumorales circulantes de cáncer de mama.
6. Determinar si las CTCs expresan el receptor de alta afinidad para la neurotensina que pueda ser utilizado como vía de terapia génica del cáncer de mama.

Capítulo 8

Hipótesis

8.1 Conjunto de Hipótesis

8.1.1 Hipótesis 1

Las transfusiones de paquete globular que se realizan bajo las normas oficiales en todo el mundo, tienen el riesgo de la transferencia de células tumorales circulantes de mama.

8.1.2 Hipótesis 2

Las células tumorales circulantes conservan un patrón transcripcional tejido específico que permite identificar el tipo de cáncer de mama aunque este se encuentre en etapa subclínica.

8.1.3 Hipótesis 3

El patrón de expresión de ARN mensajeros presentes en las células tumorales circulantes de cáncer de mama permiten conocer las preferencias metastásicas del tumor primario.

Capítulo 9

Metodología

9.1 Tipo de estudio

Mediante un estudio prospectivo transversal se evaluará la expresión génica y de marcadores celulares en mujeres clínicamente sanas de una sola cohorte.

9.2 Selección de la muestra

Se realizará un muestreo en un solo bloque integrado por muestras de mujeres donadoras de sangre

9.3 Tamaño de la muestra

En base a la frecuencia de diagnóstico de cáncer de mama en las campañas de tamizaje, en las que se encontró un 6.5 % de pacientes con imágenes radiológicas, mastográficas o tomográficas positivas, se calculó una muestra de 1500 mujeres donantes de sangre para integrar el estudio.

9.4 Pacientes

Se estudiarán en total de 1500 muestras sanguíneas de mujeres catalogadas como aptas para donación y que realicen dicha donación en el Banco de sangre del Hospital Regional “1º de Octubre” durante el periodo comprendido entre el 1º de Abril de 2013 al 30 de Septiembre de 2014 o hasta completar el total de la muestra.

9.5 Criterios de selección de pacientes

1. Se incluyeron mujeres que acudieron a donar sangre al banco de sangre del Hospital Regional “1º de Octubre”.
2. Mujeres que fueron catalogadas como personas aptas para la donación de sangre.
3. Mujeres que donaron sangre en el Hospital Regional “1º de Octubre” durante el periodo de Abril de 2013 a Septiembre de 2014 o hasta completar 1500 muestras.
4. Mujeres que firmaron el consentimiento informado.

9.5.1 Criterios de inclusión para la muestra de sangre

Se incluyeron en el protocolo aquellas muestras que fueron recolectadas y procesadas hasta la obtención de la fracción leucocitaria y preservadas en TRIzol hasta 24 hrs posteriores a la donación de sangre.

9.5.2 Criterios de exclusión para la muestra de sangre

Se excluyeron del protocolo a aquellas muestras que presenten degradación del material genético o contaminación con otros componentes moleculares.

9.5.3 Criterios de eliminación para la muestra de sangre

Se eliminaron las muestras de las donadoras que expresaron su deseo de “NO” seguir participando en el proyecto de investigación.

9.6 Controles positivos

Las muestras positivas a los marcadores de estudio se obtuvieron de pacientes diagnosticadas recientemente con cáncer de mama a través de estudio de biopsia. De la biopsia se obtuvo el tejido tumoral y tejido normal adyacente, además de una muestra de sangre de la paciente.

9.7 Obtención de la muestra sanguínea

A todas las posibles donadoras se les informó del desarrollo del proyecto de investigación “Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas que acuden a donar sangre” a las mujeres que asistieron al banco de sangre del Hospital Regional “1º de octubre” del ISSSTE, para donar sangre para un familiar

internado o con fines altruistas. Así mismo, se solicitó su participación mediante la donación del concentrado leucocitario obtenido por el fraccionamiento de la sangre total, autorizando su uso al firmar la carta de consentimiento informado.

Se entregó una copia de la carta de consentimiento informado a la donadora el cual contenía el número de folio con el que se registró la muestra. A cada una de las muestras se les asignó un número de control interno, para asegurar la confidencialidad de los datos de las donantes.

9.7.1 Flebotomía

De acuerdo a la **NOM-253-SSA1-2012**, antes de proceder a la extracción de la muestra se verificaron los siguientes puntos.

- Que los datos del donante coincidieran con los obtenidos en los documentos utilizados para el proceso de donación.
- Que los datos de identificación de la bolsa o de los equipos colectores, así como los datos de los tubos para muestras y los registrados en los documentos fueran coincidentes.
- Que las bolsas y equipos colectores se encontraran dentro de su periodo de vigencia, que no tuvieran daño físico (roturas, cambios en su coloración, deterioro o evidencias de contaminación.)

La extracción se realizó empleando métodos asépticos, en sistemas cerrados, evitando la entrada de aire para conservar la esterilidad. Toda punción para colectar unidades de sangre o componentes sanguíneos se hizo conforme a lo siguiente lineamientos:

- Se realizó en áreas cutáneas carentes de lesiones
- Se utilizaron técnicas asépticas
- Se utilizaron técnicas antisépticas validadas, permitiendo que el o los antisépticos empleados ejerzan su acción después de la aplicación.

El anticoagulante y en su caso, las soluciones aditivas estuvieron en proporción al volumen de sangre o componentes sanguíneos que se extrajeron.

Para la toma de muestras sanguíneas destinadas a la realización de las determinaciones analíticas y con el fin de asegurarse que corresponden a la unidad de sangre o componentes sanguíneos colectados, se empleó cualquiera de las metodologías siguientes:

- Se emplearon bolsas o equipos de colecta que permiten la toma de las muestras antes de que se inicie el proceso de llenado de la unidad de que se trataba

- Tras la extracción de las unidades, después de seccionado el tubo colector primario y sin retirar la aguja de la vena, se llenaron los tubos para las muestras, mediante el drenaje de la sangre a través del tubo colector.

El personal que realizó la extracción registró en el expediente del donante, las actividades realizadas y en su caso, las reacciones adversas, soluciones empleadas y los medicamentos prescritos.

Para la extracción de unidades de sangre total, se observaron las siguientes disposiciones oficiales:

- En toda extracción de sangre total se utilizaron bolsas con dos o más bolsas satélites a fin de posibilitar la obtención de más componentes sanguíneos.
- En caso de punción fallida, no se intentó otra punción con el mismo equipo de recolección. En ocasiones se efectuó un segundo intento utilizando un equipo nuevo, procedimiento que autorizó el donante siempre y cuando no se excedieran los volúmenes a extraer.
- Durante el llenado de una unidad de sangre, se mantuvo agitación constante para favorecer la mezcla con el anticoagulante de la bolsa.

El volumen máximo de sangre extraído en cada ocasión, fue de $450 \pm 10\%$, cuidando de no exceder los 10.5 mL/Kg de peso corporal del donante o del 13% de su volumen sanguíneo calculado.

En las bolsas contenedoras más empleadas, la cantidad de solución anticoagulante y preservadora está calculada para obtener 450 mL $\pm 10\%$. Cuando por razones técnicas no se obtuvo un mínimo de 405 mL, se procedió a:

- Si el volumen de sangre obtenido fue entre 300 y 404 mL, sólo se preparó el concentrado de eritrocitos y se anotó en su etiqueta “Unidad de bajo volumen”. A los componentes remanentes se les dió destino final
- Cuando el volumen de sangre extraído fue menor de 300 mL, se dió destino final a la unidad.

9.7.2 Fraccionamiento

El uso terapéutico de la sangre total es limitado, su utilidad primordial es para el fraccionamiento en sus diversos componentes. El intervalo entre la extracción y el fraccionamiento de la sangre total se minimizó, con el fin de conservar los efectos terapéuticos de cada uno de los componentes que la constituyen, durante este intervalo las unidades fueron mantenidas a una temperatura inferior a 24 °C, o bien, entre 2 y 10 °C, para su transporte. Los concentrados de plaquetas se obtuvieron por fraccionamiento

de sangre fresca a partir del plasma rico en plaquetas o de la capa leucoplaquetaria, o bien, mediante aféresis automatizada, el producto de leucocitación de la sangre total, fue almacenado a 4 °C, hasta realizar la separación de las células nucleadas por gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare).

9.8 Separación de células nucleadas

Las bolsas de sangre con la fracción leucocitaria se transportaron al “Laboratorio de Medicina Genómica” para la extracción del RNA total y los procedimientos subsecuentes. Las bolsas se sanitizaron con etanol al 70%, y 12.5 mL del concentrado leucocitario se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL el cual contenía 12.5 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare), la muestra se centrifugó a 3,500 rpm durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y sin freno. Del resultado de la separación por gradientes se recuperó la fracción enriquecida de leucocitos en tubos Eppendorfs de 2 mL.

9.9 Extracción de RNA total

El enriquecido leucocitario se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se les adicionaron 500 μ L de TRIzol (Gibco) y posteriormente se homogenizaron en vortex, procediendo a realizar la extracción o bien, almacenando las células a -80 °C hasta por 1 mes.

La extracción de RNA total se realizó mediante el procedimiento de isotiocionato de guanidina-fenol-cloroformo el cual consistió en: incubar durante 5 min a TA las células resuspendidas y homogenizadas en 1 ml de TRIzol, se realizó la separación de las fases adicionando 200 μ L de cloroformo, favoreciendo la compactación de proteínas mediante una agitación vigorosa durante 15 seg, incubando 5 min a TA y centrifugando a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. La precipitación del RNA se realizó al separar la fase acuosa y con adición de 500 μ L de 2-propanol (Isopropanol), se incubó 10 min a TA y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm a 4°C. Finalmente se realizó el lavado del botón obtenido, decantando el 2-Propanol y adicionando 1 mL de etanol al 75 % y centrifugando durante 10 min a 12,000 rpm a 4°C. a -80 °C y el RNA total fue resuspendido en agua grado biología molecular (GBM) ajustando el volumen de acuerdo a la cantidad de RNA obtenido.

Se evaluó la integridad del RNAtotal extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando 80 volts durante 45 min. Adicionalmente, se cuantificó la concentración de RNA total (μ g/ μ L) mediante espectrofotometría digital en un NanoDrop 8000 (Thermo-Scientific).

9.10 Retrotranscripción (RT)

Para la obtención del DNA complementario se utilizaron 5 μg de RNA total contenido en un volumen menor a 7 μL , se le adicionó 1 μL de DNasa (Invitrogen) y 1 μL de buffer de DNasa (Invitrogen), incubando 15 min a TA, y para inactivar a la DNasa se adicionó 1 μL de EDTA y se incubó a 65°C durante 15 min y 1 min en hielo. Se procedió a adicionar 1 μL de Oligo dT y se incubó durante 10 min a 70°C y posteriormente se incubó la placa de reacción en hielo durante 1 minuto, se adicionaron 7 μL de la mezcla de reacción y se incubó durante 5 min a 42°C, posteriormente se le adicionó 1 μL de la enzima retrotranscriptasa “SuperScript III” y se incubó durante 50 min a 55°C y 15 min a 70°C. Finalmente para hidrolizar el RNA del híbrido RNA-DNA se adicionó 1 μL de RNasa H y la reacción fue incubada durante 20 min a 37°C, al final del termociclado el ADNc se incubó a 4°C para proceder a su diluición con agua GBM a una relación 1:5, obteniendo un volumen final de 100 μL , finalmente se almacenó a -80°C hasta su utilización.

9.11 Verificación del proceso de RT

Para evaluar el cDNA obtenido se realizó una reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR, por sus siglas en inglés) para el gen constitutivo β -actina, para lo cual se emplearon 2 μL del producto de la RT diluido 1:5, y adicionando 22 μL de la mezcla de reacción integrada por: (18 μL de agua GBM, 2.5 μL de buffer 10X para PCR, 0.75 μL de MgCl_2 50 mM, 0.5 μL de dNTP mix 10 mM, 0.5 μL de oligo sentido de β -actina (AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT) a 10 μM , 0.5 μL de oligo antisentido de β -actina (TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA) a 10 μM y 0.25 μL (1 U) de ADN polimerasa *Taq Platinum*), bajo protocolo de termociclado específico (Tabla 9.1).

Tabla 9.1: Protocolo de termociclado para el gen β -Actina

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1 Ciclo	94 °C	5 minutos	Desnaturalización
	94 °C	40 segundos	Desnaturalización
35 Ciclos	55 °C	30 segundos	Hibridización
	72 °C	15 segundos	Extensión
1 Ciclo	72 °C	10 minutos	Extensión final
	4 °C	∞	Crioconservación

Se utilizaron oligonucleótidos universales para β -actina

Los amplicones se verificaron por el patrón de corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 60 volts durante 60 min.

9.12 RT-PCR en tiempo real para detectar CK-17, Mammaglobina A y HER2

La identificación de muestras de sangre positivas para CTCs de cáncer de mama se realizó por medio de RT-qPCR, la reacción se procesó en $20\mu\text{L}$, en placas MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), la reacción fue conformada de la siguiente manera: se colocaron $2\mu\text{L}$ de cDNA junto con $18\mu\text{L}$ de Universal Master Mix (Applied Biosystems) conteniendo $1\mu\text{L}$ de los oligonucleótidos 5' y 3' a una concentración de $40\mu\text{M}$ y se utilizaron sondas de hidrólisis TaqMan marcadas con FAM a una concentración de $10\mu\text{M}$, específicamente diseñadas para identificar la expresión de CK-17, Mammaglobina A y HER2. Para la identificación de la CK-17 se utilizaron los oligonucleótidos sentido 5'-CCG CGA CTA CAG CCA CTA CTA CAC-3', oligonucleótido antisentido 5'-GAG CCT GTT CCG TCT CAA A-3' y las sondas de hidrólisis 5'-FAM-CGT GTG CCA CCA TTG AGA ACT CCA GGA CCA CG-BHQI-3' (KRT17 (Hs01588578_m1), para la amplificación de HER2 se utilizó el oligonucleótido sentido 5'-CCC AAC CAG GCG CAG AT-3', el oligonucleótido antisentido 5'-AGG GAT CCA GAT GCC CTT GTA-3' y su identificación se realizó mediante la sonda de hidrólisis 5'-6FAM-CGC CAG ATC CAA GCA CCT TCA CCT T-TAMRA-3' (Hs00170433_m1),⁷ para mammaglobina A se utilizaron los oligonucleótidos sentido 5'-TGC CAT ATG CCA TAG ATG AAT TGA AGG AAT G-3', el oligonucleótido antisentido 5'-TGT CAT ATA TTA ATT GCA TAA ACA CCT CA-3' y su identificación se realizó con la sonda de hidrólisis 5'-FAM-TCT TAA CCA AAC GGA TGA AAC TCT GAG CAA TG-AMRA-3 (SCGB2A2 Hs00935948_m1) a una concentración de $10\mu\text{M}$. Para normalizar los valores de expresión se utilizará el gen de GAPDH, para la amplificación se utilizó como oligonucleótido sentido 5'-ACT GGA ACG GTG AAG GTG ACA-3' y antisentido 5'-CGG CCA CAT TGT GAA CTT TG-3' y como sonda de hidrólisis 5'-FAM-CAG TCG GTT GGA GCG AGC ATC CC-TAMRA-3' (ACTB Hs02758991_g1),⁷ para cada gen se determinó el valor de Ct y se interpoló la carga de CTCs a través de la segunda derivada del punto máximo de la curva de amplificación. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador de tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystem), bajo las siguientes condiciones de termociclado, un ciclo de 10 minutos de desnaturalización a 95°C , seguido de 45 ciclos de amplificación conformados por un paso de desnaturalización a 95°C durante 30 seg, un paso de hibridización a 60°C durante 1 min y un paso de extensión a 72°C durante 1 min, la fluorescencia emitida por FAM fue cuantificada al final de cada período de extensión.

9.12.1 Progresión y preferencia metastásica pulmonar

Para la determinación de la preferencia metastásica que tienen las células tumorales circulantes de cáncer de mama, se utilizaron sondas TaqMan, prediseñadas y validadas mediante ensayos de microarreglos de expresión, cada uno de éstos consta de un oligonucleótido sentido y uno antisentido que flanquean a una sonda de hidrólisis intermedia, la transcripción fue evaluada mediante reacciones de qPCR, las cuales se amplificaron en un termociclador de tiempo real 7900 HT Fast en placas de 384 pozos, los genes utilizados para esta sección fueron: ID1 (Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein “Hs03676575_s1”), MMP2 (Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72 kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase “Hs01548727_m1”), PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase “Hs00153133_m1”), CK19 (Keratin 19 “Hs00761767_s1”), MAM-A ó SCGB2A2 (Mammaglobin A), Secretoglobin, family 2A, member 2 “Hs00935948_m1”), PSEN2 o PS2 (Presenilin 2 “Hs00240982_m1”), EPCAM o EGP2 (Epithelial cell adhesion molecule “Hs00901885_m1”), TP53 o p53 (Tumor protein p53 “Hs01034249_m1”), BCAR1 (Breast cancer 1 “Hs01556193_m1”), NTSR1 (Neurotensin receptor 1 high affinity “Hs00901551_m1”), NTSR2 (Neurotensin receptor 2 “Hs00892563_m1”) y PRLR (Prolactin receptor “Hs01061477_m1”).

9.12.2 Normalización

Para asegurar que la calidad de los resultados de PCR sea máxima, se utilizaron los genes constitutivos: GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase “Hs02758991_g1”), β -actina (Actin, beta “Hs99999903_m1”), CXCL11 (Chemokine “C-X-C motif” ligand 11 “Hs00171138_m1”), CXCL16 (Chemokine “C-X-C motif” ligand 16 “Hs00222859_m1”) en la normalización del resultado en el **Índice de cambio** = $2^{-\Delta\Delta CT}$.

9.13 Tamaño de la muestra

Para calcular la muestra se tomó como desenlace primario a la presencia de los genes CK17, MAM-A y HER2, por lo que con sus frecuencias de expresión, se realizó la estimación hipotética a un 6.5% de muestras positivas contra un 98% de positivas en los grupos controles, acorde a los datos reportados en la literatura para las pacientes con cáncer de mama diagnosticadas bajo las directrices de la norma oficial, la muestra se calculó utilizando la incidencia del cáncer de mama en la población mexicana, con un nivel de confianza del 95 %, un intervalo de confianza del 2.6%, con un error α de 0.5, y se estimó la población femenina de México en 50,000,000. De esta manera se estimó que la muestra estaba integrada por 1420 mujeres, para balancear el estudio se decidió tener un bloque de 1500 mujeres clínicamente sanas.

9.14 Análisis de resultados

Los datos de presencia y ausencia en la expresión de los genes de identificación y de preferencia metastásica se almacenaron en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico mediante el uso del software QTIPlot, se utilizó estadística descriptiva las variables cuantitativas se analizaron mediante la prueba t de *student*, para los grupos individuales y una anova para comparaciones múltiples.

Capítulo 10

Resultados

El estudio lo integraron 1502 muestras de sangre provenientes de mujeres que acudieron al banco de sangre del Hospital Regional “1° de Octubre”, en el ISSSTE (Tabla 10.1), de las cuales se eliminaron a 320 ya que el ARN mensajero mostraba degradación en el corrimiento electroforético y por consecuencia la amplificación del gen de β -Actina fue negativo. Para determinar si el problema fue en la retrotranscripción 274 de las muestras eliminadas fueron reextraídas y retrotranscritas, observando el mismo comportamiento. El 84.4 % de las muestras estuvieron en condiciones de trabajarse para realizar la identificación de los genes planteados en el proyecto.

Tabla 10.1: Muestras estudiadas

<i>Muestras</i>	<i>Perfil Transcripcional</i>			<i>ID</i>	<i>Totales</i>	
	<i>Sangre</i>	<i>Tumor</i>	<i>Adyacente</i>	<i>CTCs</i>	<i>Perfil</i>	<i>General</i>
Recibidas	43	43	43	1502	129	1631
Íntegras	18	22	15	1268	55	1323
Desechadas	25	21	28	320	74	394
Reextracciones	0	0	0	274	0	274
Extracciones totales	43	43	43	1776	129	1905
RT	27	21	23	1456	71	1527
β-Actina	18	22	15	1456	55	1511

RT: Retrotranscripciones

β -Actina: Verificaciones de RT

El total de muestras que presentaron ARN total de buena calidad (Figura 10.1), se retrotranscribieron. Posteriormente el proceso se verificó mediante la amplificación del gen de β -Actina y solamente las muestras que presentaron un patrón de electroforesis correspondiente con el peso de 218 pb esperado para el amplicón de β -Actina se consideraron para la siguiente fase (Figura 10.2). El 71.8% de las muestras obtenidas cumplieron con los estándares moleculares establecidos, por lo que al 20 % del total de las muestras se les dio destino final junto con los datos personales de los pacientes que las donaron.

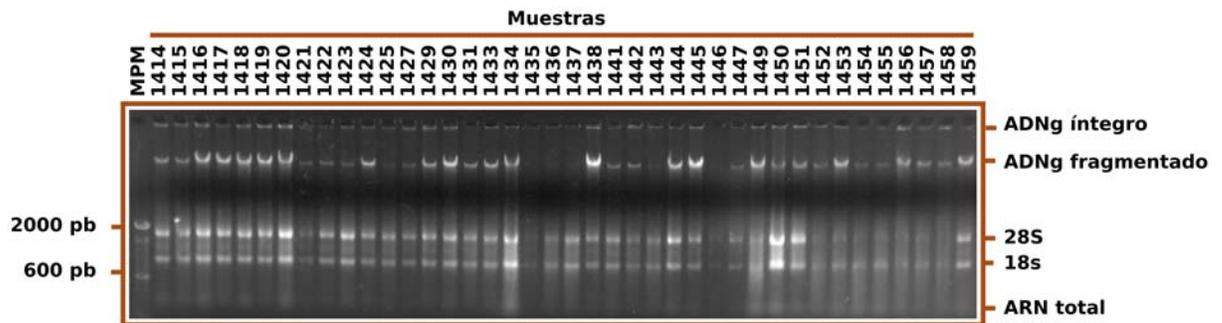


Figura 10.1: Patrón de corrimiento electroforético de ARN total: La fotografía muestra una imagen representativa del patrón de corrimiento electroforético de ARN total que presentaron algunas muestras donadas por mujeres catalogadas como: “Clínicamente sanas y aptas para la donación”. El corrimiento se realizó en un gel de agarosa al 1% a 80 volts durante 45 min.

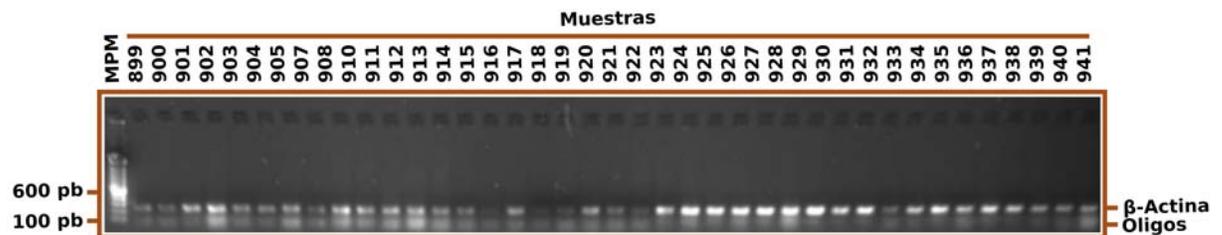


Figura 10.2: Amplificación del gen de β -Actina por PCR de punto final: Imagen representativa del patrón de corrimiento electroforéticos del amplicón de β -Actina en gel de agarosa al 2%.

El 80% de las muestras fueron positivas para el amplicón de β -Actina. A partir de las muestras positivas se realizó la estandarización de las reacciones de PCR en tiempo real para determinar el perfil de transcripción de los genes MAM- α , HER2 y CK17, a partir de 5 μ g de ARN total retrotranscritos y diluido en relación 1:5, se determinó el CT de cada una de las muestras a estandarizar, se utilizaron 2.5 μ L de ADN complementario, 0.25 μ L de la sonda y 2.5 2X qPCR Master Mix, y se sometió a protocolo de termociclado estándar para tiempo real, para los genes problema se obtuvieron CTs mayores a 25 ciclos, a la par

se utilizó como control interno de qPCR al gen constitutivo GA₃PDH que codifica para la enzima limitante del ciclo de Kreb's, el CT de este gen fue superior a 20 ciclos (Figura 10.3).

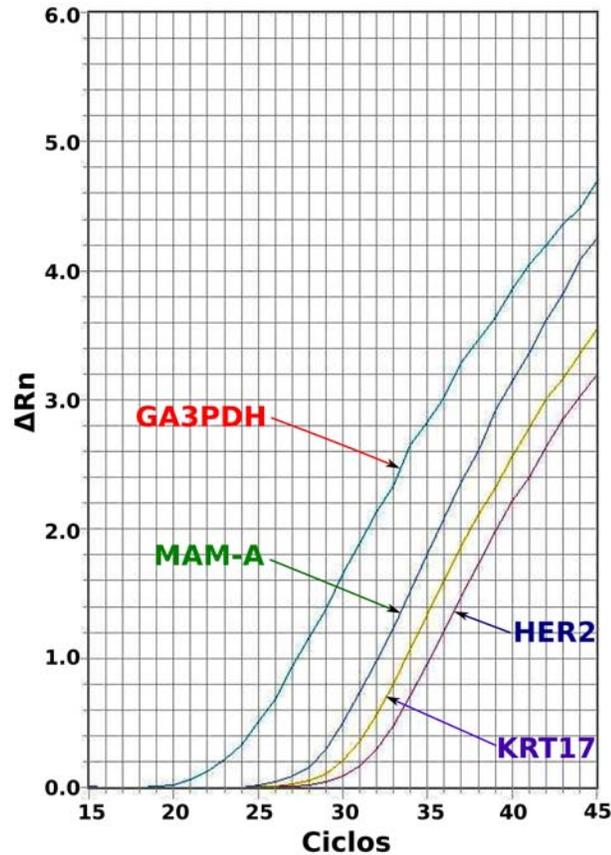


Figura 10.3: Panel de identificación: La identificación de las mujeres clínicamente sanas en las que se puede establecer un diagnóstico temprano de cáncer de mama, se realizó con la amplificación por PRC en tiempo real de los genes: **GA3PDH** = Glyceraldehide 3 phosphate dehydrogenase, **MAM-S** = Mammaglobin A (Secretoglobin, family 2A, member 2), **HER2** = V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 o neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) y **KRT17** = Citokeratin 17

Mediante los estudios de PCR en tiempo real se identificaron un total de 11 pacientes positivas para los genes de rastreo (Tabla 10.2): se determinó que el 9% (n =1) de la muestras presentó el fenotipo (MAM-A+KRT17), el 64% (n=7) tiene un fenotipo (MAM- α +HER2) y el 27% (n=3) mostró un fenotipo triple positivo (MAM-A+HER2+KRT17).

En la conformación de la lista de pacientes con diagnóstico molecular de cáncer de mama en etapa subclínica solamente se incluyeron las donantes que fuesen positivas a 2 de los marcadores seleccionados, dándole más importancia a MAM- α y CK17, ya que estos genes no deberían expresarse en las diferentes células normales que conforman al tejido sanguíneo, para el gen HER2 se considera complementario debido a que los leucocitos los

pueden expresar en baja cantidad.

Tabla 10.2: Fenotipos de las muestras positivas a cáncer de mama, los marcadores de CTCs en sangre periférica fueron identificados en experimentos realizados por triplicado.

<i>Genotipo</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
MAM-A + KRT19	1	(9)
MAM-A + HER2	7	(64)
MAM-A + HER2 + KRT17	3	(27)

MAM-S = Mammaglobin A (Secretoglobin, family 2A, member 2)

HER2 = V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)

KRT17 = Citokeratin 17

Después de la identificación de las muestras en que se pudo establecer el diagnóstico molecular de cáncer de mama, se procedió a determinar el grupo etario más afectado, a pesar de lo que se esperaba, el grupo de los 18-23 años fue el más afectado y representó el 36% con una $n = 4$, mientras que el grupo de los 45-49 años fue el segundo grupo etario en los que se encontró un 27% con una $n = 3$ (Figura 10.4)

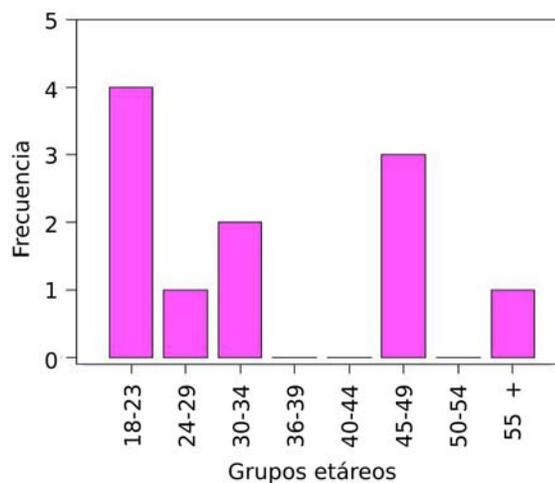


Figura 10.4: Distribución de muestras positivas a la identificación molecular de CTC's: el diagnóstico se estableció mediante el análisis transcriptómico de los genes MAM-A, HER2 y KRT17 a través de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan.

Con la información anterior y la lista de posibles candidatas a establecer el diagnóstico de cáncer de mama en etapa subclínica, se procedió a la realización de la estandarización

de la PCR en tiempo real para los genes *ESR1*, *XBP1*, *TFF3*, *KRT18*, *KRT8*, *GATA3* y *FOXA1*, completando el panel con el gen constitutivo *GA₃PDH*. En el panel ampliado de origen tumoral los CTs de los diferentes genes fue de 22 a 34 ciclos (Figura 10.5).

La expresión del receptor a estrógenos fue el que mostró los CT's más bajos, mientras que su ΔRn fue uno de los más altos, lo cual indica que su ARN mensajero es muy abundante, en particular queremos centrar la atención en los genes *GATA3*, *FOXA1* y *KRT8*, en los que su expresión relativa medida por una CT mayor a 8 ΔRn , por lo que al haber concluido la estandarización de las reacciones de PCR en tiempo real, el total de las muestras que fueron positivas al panel de búsqueda, se sometieron al perfil molecular de origen celular.

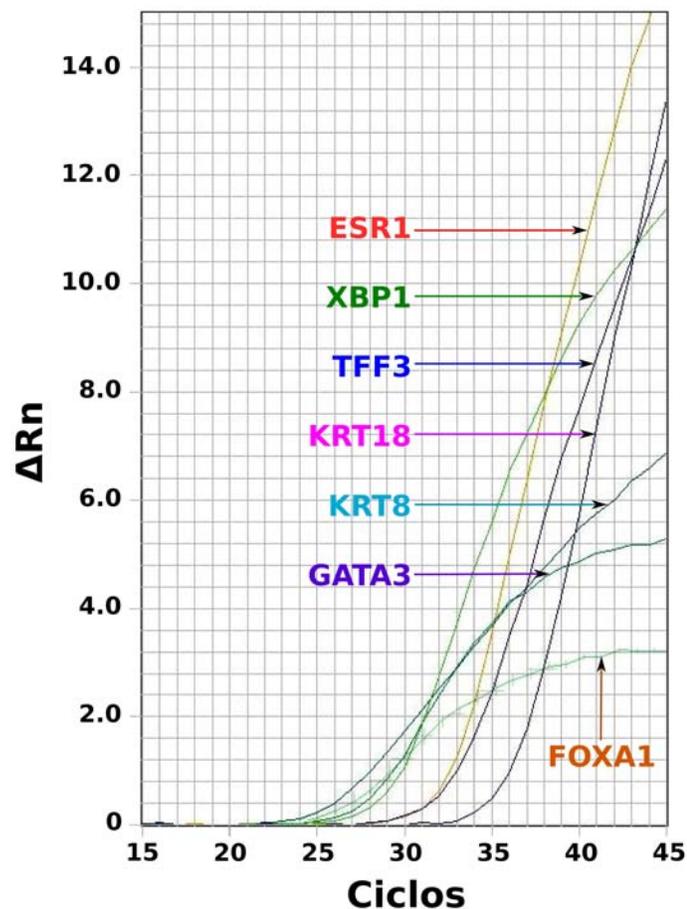


Figura 10.5: Panel de origen tumoral: La identificación molecular del origen tumoral permite establecer el tratamiento y el pronóstico, así como la evolución que mostrará la patología, los genes que permiten la clasificación luminal son: **ESR1** = Estrogen receptor 1, **FOXA1** = Forkhead box A1, **GATA3** = GATA binding protein 3, **KRT8** = Keratin 8, **KRT18** = Keratin 18, **SLC39A6** = Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6, **TFF3** = Trefoil factor 3, **XBP1** = X-box binding protein 1.

El análisis transcripcional del perfil de origen molecular reveló que el 57% (n = 4) de las muestras fueron positivas a 6 de los 7 genes evaluados, en el resto la expresión génica fue de 3 a 5 genes marcadores de origen luminal (Tabla 10.3), de éstas solamente en 3 muestras se evidenció la presencia de 3 genes, los cuales correspondieron a ESR1, KRT18 y XBP, que son los mínimos requeridos para establecer el origen luminal de las CTCs encontradas en estas pacientes (Figura 10.5).

Tabla 10.3: Marcadores de origen luminal: La presencia de estos marcadores en las muestras de estas pacientes nos permite catalogarlas dentro de la clasificación molecular en cáncer de mama tipo luminal.

<i>Muestra</i>	<i>ESR1</i>	<i>FOXA1</i>	<i>GATA3</i>	<i>KRT8</i>	<i>KRT18</i>	<i>TFF3</i>	<i>XBP1</i>
550	+	+	+	-	+	+	+
687	+	-	+	+	+	+	+
692	+	-	+	+	-	-	+
758	+	-	+	+	-	+	+
759	+	-	+	+	-	+	+
765	+	-	+	+	-	+	-
776	+	+	+	+	-	+	+
789	+	-	+	-	-	+	+
798	+	-	+	-	-	-	+
810	+	-	+	+	+	+	+
846	+	-	-	-	+	-	+

ESR1 = Estrogen receptor 1, **FOXA1** = Forkhead box A1, **GATA3** = GATA binding protein 3, **KRT8** = Keratin 8, **KRT18** = Keratin 18, **SLC39A6** = Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6, **TFF3** = Trefoil factor 3, **XBP1** = X-box binding protein 1

La identificación del origen tumoral, nos permitió plantear la posibilidad de buscar genes marcadores de respuesta terapéutica, para tal efecto utilizamos los genes ESR1, PRLR y HER2 genes sobre los cuales se establece la clasificación terapéutica del cancer de mama, se detectó que el 36% de las muestras positivas para el perfil básico de identificación de CTCs en sangre periférica, es triple positivo para los genes estudiados, solamente el 9% (n = 1) fue positiva al gen del receptor de estrógenos (ESR1), mientras que el 54% (n = 6) fueron positivas a los receptores ESR1 y PRL1 (Tabla 10.4).

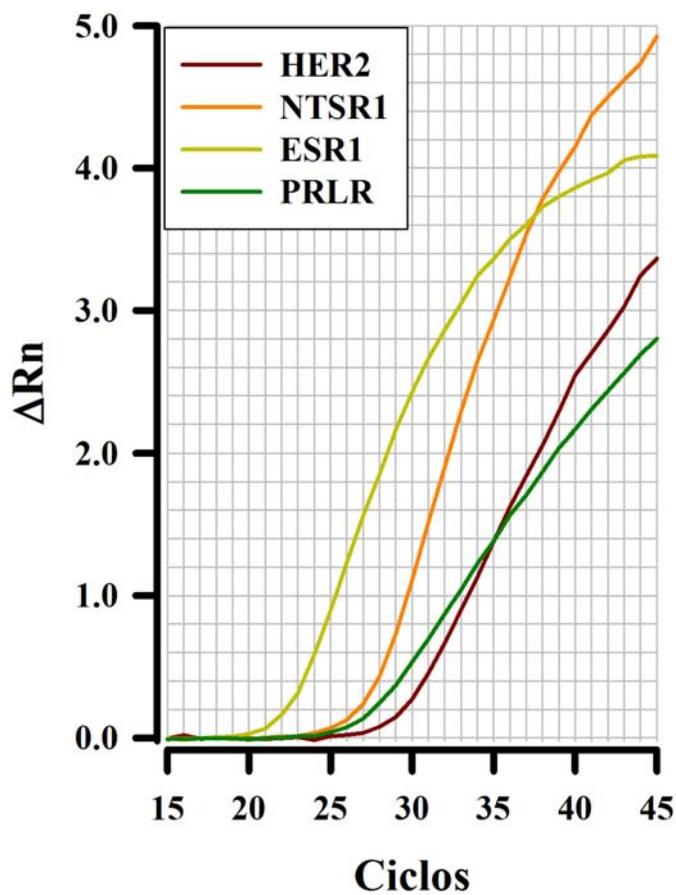


Figura 10.6: Panel de clasificación y pronóstico del cáncer de mama: Curvas representativas de la amplificación de los genes HER2, NTS1, ESR1 y PRLR, los cuales permiten hacer la clasificación del tumor y establecer una posible acción terapéutica.

También se realizó la amplificación del gen para el receptor a neurotensina de alta afinidad (NTSR1) (Figura 10.6) el cual se consideró como marcador pronóstico y de agresividad tumoral, los resultados muestran que el 91% ($n = 10$) de las muestras sospechosas de cáncer de mama son positivas para dicho receptor. (Tabla 10.4)

Tabla 10.4: Marcadores terapéuticos y pronóstico de cáncer de mama: La presencia del gen NTSR1 es un indicativo de la agresividad del tumor.

<i>Muestra</i>	<i>ESR1</i>	<i>PRLR</i>	<i>HER2</i>	<i>NTSR1</i>	<i>Origen Molecular</i>	<i>Agresividad</i>
550	+	+	+	+	Luminal A	Alta
687	+	+	+	+	Luminal A	Alta
692	+	-	-	+	Luminal A	Alta
759	+	-	+	+	Luminal B	Alta
759	+	-	+	-	Luminal B	Baja
765	+	-	+	+	Luminal B	Alta
776	+	-	+	+	Luminal B	Alta
789	+	+	+	+	Luminal A	Alta
798	+	-	+	+	Luminal B	Alta
810	+	-	+	+	Luminal B	Alta
846	+	+	+	+	Luminal A	Alta

ESR1 = Estrogen receptor 1, **PRLR** = Prolactin receptor, **ERBB2 (HER2)** = v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) y **NTSR1** = Neurotensin receptor 1 (high affinity)

Además se identificó el perfil transcripcional de preferencia metastásica (Figura 10.7) y el análisis individual de la expresión (Tabla 10.5) reveló que el 72% de la muestras fue positivo al gen ID1, el 18% fue positivo al gen MMP2 y 82% fue positivo para el gen PTGS2.

Se detectó que el 9% de las muestras identificadas como portadoras de CTC's, muestran la expresión de los tres genes investigados (ID1, MMP2 y PTGS2), de la misma forma el 9% de las muestras fueron triplemente negativas, el 9% (n = 1) de las muestras fue positiva solamente al gen (PTGS2), de igual forma se observó que el 9% de las muestras fue positiva al gen (ID1), mientras que el 54% de las muestras fue positiva a los genes (ID1 y PTGS2).

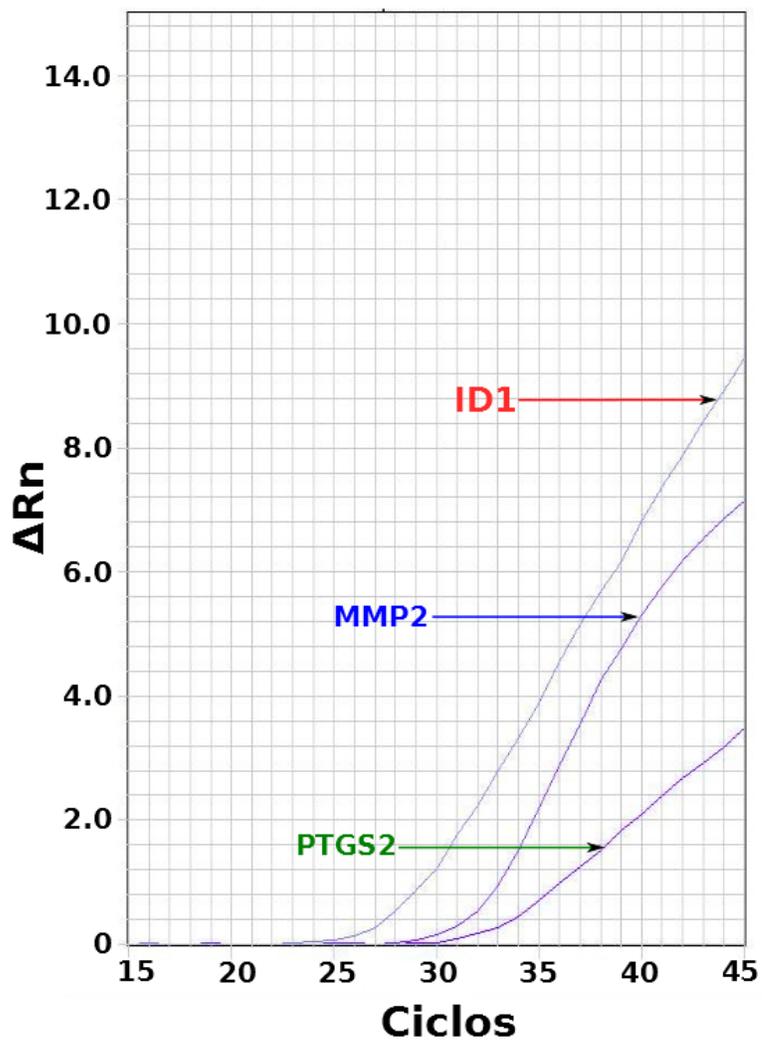


Figura 10.7: Panel de preferencia metastásica pulmonar: Curvas representativas de la amplificación de los genes ID1, MMP2 y PTGS2, los cuales permiten establecer la preferencia metastásica hacia el parénquima pulmonar.

Tabla 10.5: Perfil transcripcional característico de preferencia metastásica hacia pulmón.

<i>Muestra</i>	<i>ID1</i>	<i>MMP2</i>	<i>PTGS2</i>
550	-	+	+
687	+	+	+
692	-	-	-
758	+	-	+
759	+	-	+
765	+	-	+
776	+	-	-
789	+	-	+
798	+	-	+
810	+	-	+
846	-	-	+

ID1 = Inhibitor of DNA binding 1, (dominant negative helix-loop-helix protein).

MMP2 = Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase).

PTGS2 = Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase).

Discusión

Actualmente el número de mujeres con cáncer de mama ha aumentado considerablemente, por lo que la confirmación del diagnóstico es crucial para establecer una terapéutica específica encaminada a la remisión.

Se ha establecido que cada tumor tiene una firma diferencial y que ésta le proporciona los mecanismos moleculares de preferencia metastásica, de pronóstico, así como también de respuesta terapéutica. En este estudio se eligió al gen que codifica para la proteína Mam- α como un marcador molecular de la presencia de células tumorales circulantes de cáncer de mama, debido a que de acuerdo a los estudios, es un gen tejido específico de mama y en trabajos recientes se ha demostrado que su expresión aumenta en condiciones de oncopatología.¹¹⁰

Otro gen elegido para establecer la búsqueda de mujeres con un posible diagnóstico molecular de cáncer de mama fue el gen HER-2, este gen se ha descrito como un marcador diagnóstico y se ha utilizado ampliamente en la clínica para establecer el tipo de tratamiento anti-metabólico que se debe emplear, aunque se ha descrito que los leucocitos humanos expresan de manera natural dicho receptor,¹⁵⁴ por lo que su aplicación en el diagnóstico molecular de CTC's es relevante cuando se sobreexpresa en conjunto con MAM- α . Finalmente estos marcadores se combinaron con la presencia del gen que codifica para CK17, una citoqueratina tejido específica, que se ha descrito principalmente en el epitelio de la glándula mamaria, sin embargo su especificidad no es exclusiva de la mama, al igual que los otros dos marcadores, se ha descrito que en el tejido tumoral de la mama existe una sobre transcripción.

Una vez conformado el primer panel de búsqueda diagnóstica con los genes MAM- α , HER-2 y CK17, se procedió a la identificación de las mujeres donantes de sangre que fuesen positivas al menos a dos de los marcadores moleculares.

En nuestro trabajo se incluyeron 1501 muestras de sangre de mujeres que acudieron a donar sangre, de éstas, el 1% fue positiva bajo los criterios de diagnóstico molecular previamente establecidos, lo cual representa a un total de 11 mujeres en las que se puede

establecer el diagnóstico subclínico de cáncer de mama. Cabe recordar que éstas fueron catalogadas en una valoración previa como clínicamente sanas y aptas para la donación.

Los resultados de un estudio realizado en Japón con secretarías del sistema burocrático, revelaron que más del 16% de ellas eran positivas a MAM- α , sin embargo el rango de edad que ellos emplearon fue mayor a los 45 años.¹⁵⁵ Nuestro estudio, por otro lado, empleó un amplio rango de edad y el grupo en el que encontramos un mayor número de mujeres positivas a MAM- α fue el de menos de 45 años, por lo que en aquellas pacientes en las que se identificó su transcripción se esperaría una evolución rápida y fatal. A pesar de que Mam- α ha sido ampliamente utilizada como marcador de CTCs, recientemente se le ha dado un valor pronóstico desfavorable a corto plazo.¹⁵⁶

Es importante mencionar que el diagnóstico de CTC's implica que estas células deben expresar una maquinaria molecular que les permita invadir a otros tipos de tejidos. En estudios clínicos se ha demostrado que el cáncer de mama tiene 3 sitios preferenciales en los que genera metástasis: parénquima pulmonar, cerebral y tejido óseo, con la finalidad de establecer la preferencia metastásica de las CTC's identificadas en mujeres clínicamente sanas se conformó un segundo panel que investigase dicha característica. Lo anterior surge de la necesidad de establecer una terapéutica oportuna en las mujeres que presenten cáncer de mama, así como predecir la trayectoria de las células estudiadas para evitar futuras recidivas. Además, puede observarse que se detectaron 11 de 1500 muestras estudiadas, lo que corresponde a 7.3 casos por cada mil donantes clínicamente sanas, valor que es más alto que la mastografía que detecta 4.7 casos por cada mil estudios realizados en mujeres de 40-49 años con historia familiar de cáncer.

De acuerdo a un estudio, después de la estimulación mitogénica en células la expresión del gen ID se induce rápidamente (dentro de 1-2 horas) como parte de una cascada de genes de respuesta “retardada”. Después de un descenso inicial, la expresión ID se mantiene durante toda la fase G1 del ciclo celular y es regulada en las células que entran en la fase S.¹⁵⁷ El gen ID1 genera dos isoformas de la proteína a través de procesamiento o “*splicing*” alternativo: ID1a e ID1b que se contrarregulan en condiciones oncogénicas.

Lo anterior coincide con los resultados obtenidos, puesto que se presentó amplificación para este gen en el 72% de los casos positivos a Mam- α , lo que permite determinar que la transcripción de las células tumorales estudiadas concuerda con un fenotipo oncogénico. Específicamente para cáncer de mama, en un estudio en el que se analizó el papel de ID1 e ID2 mediante la asociación la expresión de mRNA con parámetros clínico-patológicos, se encontró que los pacientes que estaban libres de la enfermedad tenían una menor expresión de ID1, mientras que su sobreexpresión se asoció con un pronóstico desfavorable a corto plazo.¹⁵⁹

Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de ID1 regula positivamente la expresión de la proteína MT1-MMP, que le permite a las células de cáncer de mama realizar la invasión de otros tejidos.¹⁶⁰ Sin embargo, sólo el 18% de las muestras estudiadas

presentaron amplificación para MMP2, por lo que es importante mencionar que MMP2 se presenta en forma de depósitos en las células cancerosas y los fibroblastos.¹⁶¹ En otros estudios se ha observado que las células del estroma contienen una mayor cantidad de la proteína MMP-2 cuando se compara con las células tumorales,¹⁶² lo cual podría explicar que las células cancerosas periféricas no amplificaran dicho gen, o bien podría indicar que cuando las CTC's atraviesan la membrana endotelial de los vasos sanguíneos, ya no expresaban esta maquinaria. Sin embargo ya ha sido descrito que la sola expresión de la gelatinasa activa A (MMP2) es suficiente para inducir la transformación epitelial-mesenquimal,¹⁶³ por lo que las muestras que resultaron positivas a dicha expresión tienen mayor posibilidades de producir metástasis.

Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de PTGS2 o también conocida como COX-2 induce la producción de ID1 en células de glioblastoma multiforme (GBM), lo que sugiere que ID1 participa directamente en la transformación oncogénica del glioma aumentando el potencial invasor, migratorio y vasculogénico.¹⁶⁴

En múltiples estudios se ha establecido que COX-2 se expresa de forma constitutiva durante el proceso oncogénico en la glándula mamaria y la sobreexpresión depende del estadio, la progresión y la etapa metastásica en que se encuentre el cáncer de mama. Las evidencias científicas apoyan claramente la idea de que el proceso de carcinogénesis en la mama, a menudo se desarrolla como una serie progresiva de cambios celulares y moleculares altamente específicos en respuesta a la sobreexpresión de COX-2, mientras que la síntesis de prostaglandinas apoyan la teoría inflamatoria del cáncer de mama. De esta manera, los resultados obtenidos en nuestro trabajo se apoyan ampliamente por estas observaciones, ya que el 82% de las muestras expresan dicho gen. Cabe recalcar que en un estudio en el que se analizó el impacto pronóstico de la expresión de COX-2, se establece a dicho marcador como indicador de mal pronóstico.¹⁶⁵

La neurotensina (NT) es un péptido neuroendócrino que ejerce efectos tróficos *in vivo* y estimula el crecimiento de líneas celulares de cáncer *in vitro*. La neurotensina ejerce su acción biológica mediante la activación de tres tipos de receptores: NTSR1 también conocido como receptor de alta afinidad, NTSR2 conocido como receptor de baja afinidad y a través del receptor NTSRs conocido como receptor sortilina o soluble. Los receptores de neurotensina de alta afinidad (NTSR1) se expresan en líneas celulares derivadas de cáncer y en algunos tumores primarios, pero sólo en un grupo selecto de los tejidos normales. Además, se ha demostrado que la expresión de NT es estimulada por la privación de andrógenos en los modelos de cáncer de próstata.¹⁶⁶ Anteriormente se había demostrado que las interacciones entre NT y NTSR1 inducen efectos biológicos pro-oncogénicos asociados con procesos neoplásicos y la progresión del tumor.¹⁶⁷

También se ha demostrado que la NT tiene una regulación autocrina y /o paracrina y causa sobre-expresión de EGFR, HER2, HER3 y la activación de las células tumorales de pulmón. La activación autocrina EGFR y HER3 está mediada por la activación MMP1 y

EGF “similares” a los ligandos (HB-EGF, Neuregulin 1). Así, el crecimiento del tumor se modula según la expresión NT, demostrándose una tasa de crecimiento baja en aquellos tumores que no expresan NT.¹⁶⁸ En otro estudio en el cual evaluaron NT y NTSR1, se observó la sobreexpresión de ambos hasta en el 60% de los cánceres de pulmón. Así, la sobreexpresión de NTSR1 se estableció como marcador predictor de mal pronóstico en la supervivencia general de los pacientes a 5 años en una población seleccionada con adenocarcinoma de pulmón en estadio I tratada únicamente por cirugía. En un segundo estudio, la sobreexpresión NTSR1 se correlacionó con un mal pronóstico en 389 pacientes con estadio I a III de adenocarcinoma de pulmón, considerándose un marcador pronóstico independiente.¹⁶⁹ En nuestro trabajo obtuvimos un 91% de positividad a dicho gen, por lo que podemos predecir que las pacientes tendrán un desarrollo agresivo del cáncer de mama.

Es importante resaltar que, como se mencionó en la introducción de este trabajo, las CTCs muestran cierta heterogeneidad aún en las células obtenidas de un mismo paciente, y deben pasar por una selección para adquirir fenotipos que les permitan sobrevivir en el ambiente en el que se encuentren, así como para adquirir capacidad de invasión y proliferación una vez situadas en un órgano distante al sitio primario. Por lo que en parte, esto puede explicar que ciertos genes no se expresaran aún en las muestras estudiadas.

Al analizar los resultados desde la perspectiva de estudios enfocados a evaluar la metástasis en cáncer de mama, en un modelo donde se evaluaron diferentes genes, entre ellos MMP2 se observó como un miembro del subconjunto de agresividad metastásica, en contraste, la expresión de ID1, CXCL1, COX2, EREG y MMP1 no se limitó a poblaciones de metástasis de pulmón agresivos pero sí aumentó la capacidad metastásica a pulmón.¹⁷⁰ En la caracterización *in vivo* de la progresión metastásica de pulmón se reveló que ID1 e ID3 facilitan la proliferación sostenida durante las primeras etapas de la colonización metastásica, posteriores a la extravasación en el parénquima pulmonar. Dichos resultados arrojaron luz sobre los mecanismos de proliferación que inician la invasión metastásica, y que implicaron a ID1 e ID3 como mediadores de esta función maligna en el subgrupo TN de los cánceres de mama.¹⁷¹

Los estudios llevados a cabo permiten considerar ciertos genes expresados como blancos terapéuticos. Un ejemplo, es una investigación en la que estudiaron los efectos de interferir la traducción del ARN de la prostaglandina-endoperóxido sintetasa 2 (COX-2) sobre la proliferación celular y la apoptosis de las células de cáncer de mama MCF-7, así como el mecanismo subyacente. La interferencia de ARN mediada por un vector de expresión lentiviral disminuyó significativamente los niveles de expresión de proteína COX-2, y por lo tanto, se suprimió la proliferación y el crecimiento de las células de cáncer de mama MCF-7, de igual forma la tasa de apoptosis de las células tumorales aumentó significativamente. La utilización de un siRNA dirigido contra el ARN de COX2 produce la desactivación del gen y suprime la proliferación de las células MCF-7 de cáncer de mama aumentando su

apoptosis, la cual está bajo el control del gen Bax, lo anterior proporcionó evidencia de las aplicaciones potenciales de interferencia específica de ARN mensajero del gen COX-2 como una aplicación de la terapia génica antioncogénica para el tratamiento del cáncer de mama.¹⁷²

En otro estudio recientemente realizado en el CINVESTAV, en el que se empleó la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 para generar un modelo murino de cáncer de mama con fenotipo triple negativo (TNBC), el cual se considera un subtipo agresivo para el que no se tiene un tratamiento específico, estas células expresan al receptor de alta afinidad a la neurotensina (NTSR1), se empleó un nanoacarreador de genes basado en el polyplex de neurotensina (NTS), en este trabajo se trató de evidenciar la posibilidad de realizar terapia génica mediante la inyección del poliplex a través de una vía venosa. De esta manera, obtuvieron la transfección de las células tumorales previamente implantadas y se demostró que el tratamiento farmacológico con ganciclovir indujo la apoptosis logrando una disminución considerable en el tamaño del tumor. En el modelo de xenoinjerto de MDA-MB-231, las nanopartículas del NTS-Polyplex que llevan el gen suicida, se inyectaron en los tumores a través del torrente sanguíneo. Ambas vías de administración permitieron que las nanopartículas NTS-Polyplex alcanzaran y transfectaran células tumorales. Al final del experimento, el peso de los tumores transfectadas con el gen suicida fue 55% menor que la de los tumores control y la transfección intravenosa no indujo apoptosis en los órganos periféricos que expresan el receptor NTSR1, por lo que, los resultados son prometedores para establecer terapia génica en el cáncer que presente este receptor.¹⁷³

Sin embargo, es importante resaltar que el estudio realizado empleando NTS-Polyplex se ha enfocado a disminuir el tamaño del tumor, pero la metástasis es una de las principales causas de muerte en cualquier tipo de cáncer, por lo que los esfuerzos en terapia génica deben coordinarse para evitar este proceso. La perspectiva para futuros trabajos, es, por lo tanto, evaluar la terapia génica enfocada a eliminar las CTCs y DTCs que son difíciles de erradicar aún tratando a los pacientes con quimio o radioterapia, y que son las causantes de recidivas y por ende, de mal pronóstico y de tiempos cortos de enfermedad en remisión.

En nuestro trabajo, encontramos una expresión de más de 90% del gen que codifica para el receptor NTSR1, lo cual concuerda con cáncer de mal pronóstico, de alta invasividad y diseminación, hecho que está en concordancia con la mayoría de los reportes previamente descritos, la expresión del receptor NTSR1 en las CTCs de las pacientes que se encuentran en etapa subclínica es un indicativo de que en estadios tempranos de la patología, ésta tiene una alta capacidad invasiva. Sin embargo hay que recalcar que la expresión de dicho receptor en estos estadios abre una ventana de posibilidad terapéutica anti-metastásica mediante la utilización de los nanovectores acarradeadores de genes a base del poliplex de neurotensina en conjunto con la regulación transgénica de genes suicidas mediante promotores tejido específicos como es el caso de MAM- α .

Conclusiones

El 0.7 % de muestras estudiadas presentaron expresión a Mam- α , lo cual es un fuerte indicador de que las mujeres que donaron dicha muestra cursan con un proceso carcinogénico subclínico de la glándula mamaria, 7 de las 11 muestras que fueron positivas a Mam- α pertenecen a muestras de mujeres con una edad menor a los 45 años. Lo que evidencía una sensibilidad mayor para este grupo de mujeres a las cuales es difícil evaluar por técnicas de radiodiagnóstico.

La sobreexpresión de HER-2 es un indicativo de proceso neoplásico, y junto a la sobreexpresión de CK-17 permiten una integración diagnóstica más eficiente.

Los principales fenotipos obtenidos en este trabajo fueron: luminal A y luminal B, esto de acuerdo a la clasificación molecular aceptada por la “AACM”. Sin embargo, el panel de marcadores moleculares de origen permitió realizar una clasificación molecular del cáncer de mama, encontrándose otros fenotipos, en los que se evalúa la agresividad tumoral, ya que se incluye a NTSR1.

El panel de marcadores moleculares que incluye ID1, MMP2 y PTGS2 para preferencia metastásica, permitió observar 6 fenotipos diferentes. 1) negativo a los tres marcadores; 2) positivo a los tres; 3) ID1 (-), MMP2 (+) y PTGS2 (+); 4) ID1 (-), MMP2 (-) y PTGS2 (+); 5) ID1 (+), MMP2 (-) y PTGS2 (+); y 6) ID1 (+), MMP2 (-) y PTGS2 (-), los cuales permitirán una terapia dirigida y adecuada para cada paciente.

La expresión de NTSR1 genera la perspectiva de tratar a estas pacientes con terapia génica.

Capítulo 13

Observaciones generales

13.1 Diagnóstico

El panel de búsqueda integrado por los genes HER-2, MAM- α y CK17, permite identificar a las posibles pacientes que se encuentran en una etapa subclínica de cáncer de mama, principalmente la presencia de los ARN mensajeros de Mam- α y CK17 permiten establecer el diagnóstico subclínico de la patología, ya que normalmente estos mensajeros deben estar negativos en las mujeres clínicamente sanas, por lo que podemos proponer la utilización de dicho panel para la identificación masiva a población abierta para el tamizaje de cáncer de mama.

13.2 Preferencia metastásica

Una vez establecida la sospecha de diagnóstico molecular de cáncer de mama, es indispensable saber los posibles sitios en los que se pudiesen establecer las metástasis. Esto se investigó mediante el panel ID1, MMP2 y PTGS2. Este panel es capaz de predecir la implantación de la metástasis en el parénquima pulmonar, y de igual forma establece la agresividad del tumor primario.

13.3 Pronóstico

Una de las principales adversidades a las que se enfrenta el médico tratante de una paciente con cáncer de mama, es el de poder establecer el pronóstico a corto plazo ya sea estableciendo una remisión o diagnosticando un desenlace fatal, al estudiar la expresión del receptor de alta afinidad para la neurotensina se puede establecer que todos aquellos tumores de mama que lo expresan tienen un muy mal pronóstico a corto plazo, es decir que la paciente presentará multimetástasis específicas de acuerdo a las preferencias

metastásicas de las células tumorales circulantes y diseminantes. En nuestro trabajo encontramos que 10 de 11 muestras en las que se estableció el diagnóstico molecular de CTCs se expresa el receptor NTSR1, esto es concordante con el grado de malignidad del tumor y sobre todo del pronóstico así esperado, ya que todas los tumores de mama que lo expresan son sumamente agresivos, por lo que hay que tomar en cuenta que las pacientes se encuentran clínicamente sanas y con tan sólo expresar dicho receptor se pudiesen establecer micrometástasis durante esta ventana de tiempo, lo cual haría que el pronóstico de estas 10 mujeres fuese fatal en un período menor a los 5 años. Sin embargo al establecer el diagnóstico molecular se podría establecer un tratamiento agresivo, mediante una mastectomía radical seguida de múltiples sesiones de quimioterapia y si se detectase que las CTCs son quimioresistentes se podría complementar el tratamiento con radioterapia, con la finalidad de reducir las posibilidades de que las CTCs o DTCs se establezcan y se desarrolle la metástasis.

13.4 Agresividad tumoral

La sobreexpresión del gen que codifica para el receptor NTSR1 permite establecer si el cáncer de mama será de progresión rápida o lenta, y por lo tanto, es un indicador molecular que permite predecir un tiempo libre de enfermedad. Sin embargo, no todo está perdido, ya que lo que para algunos clínicos representa un grave problema, para este trabajo es una oportunidad terapéutica, ya que con la utilización de un sistema de transferencia de genes mediada por receptor para introducir un gen suicida dentro de las CTCs y DTCs, y que su expresión esté regida bajo un promotor tejido específico como es el caso del gen de Mam- α se podría establecer un protocolo experimental de terapia génica anti metastásica para el cáncer de mama.

13.5 Conclusión general

La firma molecular establecida en este trabajo es capaz de identificar a las mujeres que se encuentran en una etapa subclínica de cáncer de mama así como sus preferencias metastásicas.

13.6 Perspectivas

Una vez que las pacientes fueran informadas de dicho resultado, mediante un seguimiento en trabajo conjunto con el médico tratante, sería posible estudiar su evolución y pronóstico. Además, podría evaluarse, una posible terapéutica anti-metastásica empleando el marcador NTSR1.

Referencias

- [1] **Granados García M, Herrera Gómez A.** Manual de Oncología. *Procedimientos Médico Quirúrgicos*. 4a ed. México. *McGraw Hill*;2010.
- [2] **Cheng YC, Ueno NT.** Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2012;19(3):191-9.
- [3] **Peto J, Easton DF, Matthews FE, Ford D, Swerdlow AJ.** Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study. Office of Population Censuses and Surveys. *Int J Cancer*. 1996;65(3):275-83.
- [4] **Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Heimiki K.** Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Swede, Denmark an Finland. *N Engl Med*. 2000;343(2):78-85.
- [5] **Melchor L, Benítez J.** An integrative hypothesis about the origin and deelopment of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*. 2008;29(8):1475-82.
- [6] **American College of Radiology** ACR BI-RADS-Mammography: Breast Imaging Reporting and Data System, Breast Imaging Atlas. *ACR, Preston*. 2003:4.
- [7] **Aibar L, Santalla A, Criado MSL-, González-Pérez I, Calderón MA, Gallo JL, et al.** Clasificación radiológica y manejo de las lesiones mamarias. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 2011;38(4):141âĂŞ9.
- [8] **Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al.** AJCC cancer staging manual. 7a ed. New York, NY: Springer,2010:347-76.
- [9] **DeCherney AH, Nathan L, Goodwin TM, Laufer N.** Diagnóstico y tratamiento ginecoobstétrico. 9a ed. México. *Editorial Manual Moderno*; 2007.
- [10] **NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002.** Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Diario Oficial de la Federación. 2001. *Secretaría de Salud*. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/>
- [11] **NORMA Oficial Mexicana NOM-229SSA1-2002.** Salud ambiental. Requisitos técnicos para las instalaciones, responsabilidades sanitarias, especificaciones técnicas para los equipos y protección radiológica en establecimientos de diagnóstico médico con rayos X. Diario Oficial de la Federación. 2002. *Secretaría de Salud*. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/>
- [12] **Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V.** Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-60.
- [13] **Li CI, Uribe DJ, Daling JR.** Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93:1046-52.
- [14] **Jiménez-Villanueva X, Hernández-Rubio A, García-Rodríguez FM, García RG, Moreno-Eutimio M, Herrera-Torre A.** Medullary carcinoma experience in breast oncology unit of Hospital Juárez Mexico. *Cir Cir*. 2014;82(1):20-7.
- [15] **Robertson FM, Bondy M, Yang W, Yamauchi H, Wiggins S, Kamrudin S, et al.** Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(6):351-75.
- [16] **Lee HW, Kim TE, Cho SY, Kim SW, Kil WH, Lee JE, Nam SJ, Cho EY.** Invasive Paget disease of the breast: 20 years of experience at a single institution. *Hum Pathol*. 2014;45(12):2480-7.

- [17] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**;406(6797):747-52.
- [18] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2001**;98(19):10869-74.
- [19] Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clinical Cancer Research*. **2008**;14(5):1368-76.
- [20] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. **2004**;10:5367-74.
- [21] Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*. **2006**;7(1):127.
- [22] Park S. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. **2012**. 21(1): 50-7.
- [23] Miller E, Lee HJ, Lulla A, Hernandez L, Gokare P, Lim B. Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy. *F1000Research*. **2014**. Disponible en: <http://f1000research.com/articles/3-198/v1>
- [24] Cancer Mundial, International Agency for Research on Cancer, IARC. Diponible en: <http://www-dep.iarc.fr>
- [25] Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*. bf 2014. e-p.
- [26] Beaulieu N, Bloom DE, Reddy Bloom L, Stein RM. Breakaway: The global burden of cancer-challenges and opportunities. *A report from the Economist Intelligence Unit*. **2009**. Disponible en: http://viewswire.eiu.com/report_dl.asp?mode=fi&fi=1882281973.PDF&rf=0
- [27] Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. **2009**;6(12):718-30.
- [28] Ottman R, Pike MC, King MC, Henderson BE. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet*. 1983;83(8349):556-558
- [29] Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet*. **1997**;61(1):120-128.
- [30] Group ABCS. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *British journal of cancer*. **2000**;83(10):1301.
- [31] Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected *Cells Science*. **1999**;284(5418):1354-1356.
- [32] Huang B, Warner M, Gustafsson J-Á. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2014**. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720714003712>
- [33] Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, et al. Prevention of Breast Cancer in Postmenopausal Women: Approaches to Estimating and Reducing Risk. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. **2009**;101(6):384-98.
- [34] Chambless LB, Kistka HM, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. **2014**. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- [35] Bicley LS, Szilagy PG. Bate's guide to physical examination and history taking. 10ª ed. EUA: *Lippincott Williams & Wilkins*. **2008**:402.
- [36] Smeltzer SC, Bare BG. Enfermería médico-quirúrgica. 8ª ed. México: *McGraw-Hill Interamericana*. **1998**;2:1311-1313.
- [37] Torres Mejía G, Knaul FM, Ortega-Olvera C, Magaña-Valladares L, Uscanga-Sánchez SR, Lazcano Ponce E. Detección temprana y manejo integral del cáncer de mama. *Manual para personal de medicina y enfermería del primer nivel de atención. Instituto Nacional de Salud Pública. México*. **2011**.
- [38] Humphrey LL, Helfand M, Chan BK, Woolf SH. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the US. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. bf 2002;137:347-60.

- [39] **Sánchez-Basurto C, Sánchez Forgach ER, Gerson R.** Tratado de las enfermedades de la glándula mamaria. 2da ed. México: *Alfil*. **2010**; vol 1.
- [40] **Hatfield GP, Hogan MT.** The role of ultrasound in breast imaging. *WV Med J*. **2009**;64-6.
- [41] **Tercera revisión del Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario.** *Ginecol Obstet Mex*. **2010**;78(2):138-150
- [42] **Lehman CD, DeMartini W, Anderson BO, Edge SB.** Lehman Indications for breast MRI in the patient with newly diagnosed breast cancer. *J Natl Compr Canc*. **2009**;7(2):193-201.
- [43] **Agrawal G, Su MY, Nalcioğlu O, et al.** Significance of breast lesion descriptors in the AC RIBI-RADS. *Cancer*. **2009**;115:1363-80.
- [44] **Pauwels EK, Coumou AW, Kostkiewicz M, et al.** Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography imaging in oncology: initial staging and evaluation of cancer therapy. *Med Princ Pract*. **2013**. Disponible en <http://www.karger.com/Article/FullText/346303>.
- [45] **Noadel RM.** Breast cancer imaging devices. *Semin Nucl Med*. **2011**;41:229-41.
- [46] **Henry MM, Thompson JN.** Cirugía Clínica. 5a ed. Barcelona: *Mason*. **2005**:418.
- [47] **Lieske B, Ravichandran D.** Role of fine-needle aspiration cytology and core biopsy in the preoperative diagnosis of screen-detected breast carcinoma. *Br J Cancer*. **2006**;95(1)62-6.
- [48] **Yu YH, Mo QG, Zhu X, Gao LQ, Liang C, Huang Z, et al.** Axillary fine needle aspiration cytology is a sensitive and highly specific technique for the detection of axillary lymph node metastasis: a meta-analysis and systematic review. *Cytopathology*. **2014**.
- [49] **Ha D, Dialani V, Mehta TS, Keefe W, Iuanow E, Slanetz PJ.** Mucocele-like lesions in the breast diagnosed with percutaneous biopsy: is surgical excision necessary? *AJR Am J Roentgen*. **2015**;204(1):204-10.
- [50] **Ursaru M, Jari I, Popescu R, Negru D, Naum A, Scripcariu V.** Multifactorial analysis of local and lymph node recurrences after conservative or radical surgery for stage 0-II breast cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. **2014**;118(4):1062-7.
- [51] **Gahm J, Hansson P, Brandberg Y, Wickman M.** Breast sensibility after bilateral risk-reducing mastectomy and immediate breast reconstruction: a prospective study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. **2013**;66(11):1521-7.
- [52] **Sierra García A.** Advances of the surgery of the breast cancer with help of the nuclear medicine. *An R Acad Nac Med (Madr)*. **2009**;126(2):323-34.
- [53] **Warren LE, Punglia RS, Wong JS, Bellon JR.** Management of the regional lymph nodes following breast-conservation therapy for early-stage breast cancer: an evolving paradigm. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **2014**;90(4):772-7.
- [54] **Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K.** The Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. **2014**;9(12):e115103.
- [55] **Bernier J.** Post-mastectomy radiotherapy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. **2014**. pii: S1040-8428(14)00171-1.
- [56] **Rampurwala MM, Rocque GB, Burkard ME.** Update on adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. **2014**;8:125-33.
- [57] **Barros AC, Hanna SA, Carvalho HA, Martella E, Andrade FE, Piato JR, Bevilacqua JL.** Intraoperative full-dose of partial breast irradiation with electrons delivered by standard linear accelerators for early breast cancer. *Int J Breast Cancer*. **2014**:568136.
- [58] **Gibson L, Lawrence D, Dawson C, Bliss J.** Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. **2009**;7;(4)
- [59] **Rajan SS, Sharma SC, Kumar N, Kumar R, Singh G, Singh R, Tomar P.** Clinical and cosmetic results of breast boost radiotherapy in early breast cancer: A randomized study between electron and photon. *J Cancer Res Ther*. **2014** ;10(4):889-95.
- [60] **Choi H, Lui A, Ogony J, Jan R, Sims PJ, Lewis-Wambi J.** Targeting interferon response genes sensitizes aromatase inhibitor resistant breast cancer cells to estrogen-induced cell death. *Breast Cancer Res*. **2015**;17(1):6.
- [61] **Albanell J, Ciruelos EM, Lluch A, Muñoz M, Rodríguez CA.** Trastuzumab in small tumours and in elderly women. *Cancer Treat Rev*. **2014**;40(1):41-7.

- [62] Fouad A, Yousra A, Kaoutar Z, Omar el M, Afaf A, Sanae B. Molecular classification of breast cancer in Morocco. *Pan Afr Med J.* 2012;13:91.
- [63] Furjelova M, Kovalska M, Jurkova K, Chylikova J, Mestanova V, Adamkov M. Correlation of carbonic anhydrase IX expression with clinico-morphological parameters, hormonal receptor status and HER-2 expression in breast cancer. *Neoplasma.* 2015;62(1):88-97.
- [64] Jia H, Jia W, Yang Y, Li S, Feng H, Liu J, et al. HER-2 positive breast cancer is associated with an increased risk of positive cavity margins after initial lumpectomy. *World J Surg Oncol.* 2014;12:289.
- [65] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105-111.
- [66] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
- [67] Bordón-Rodríguez E, Goés-Fontes Neto F, et al. Estudios predictivos y moleculares de invasión y metastásis. *Biocancer.* 2007. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/182>
- [68] Blagosklonny MV. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(6):621-7
- [69] Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 2011;14:264-71.
- [70] Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004;116:235-46.
- [71] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
- [72] Menendez JA, Alarcón T. Metabostemness: a new cancer hallmark. *Front Oncol.* 2014;4:262.
- [73] Pacini N, Borziani F. Cancer stem cell theory and the warburg effect, two sides of the same coin? *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8893-930.
- [74] Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Patología estructural y funcional. *Molecular biology of cell.* 1994;1993:1255.
- [75] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10:789-99.
- [76] Goel A, Mathupala SP, Pedersen PL. Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278:15333-40.
- [77] Liu X, Wang X, Zhang J, Lam EK, Shin VY, Cheng AS, et al. Effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene.* 2010;29:442-50.
- [78] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009;460:1132-5.
- [79] Godar S, Ince TA, Bell GW, Feldser D, Donaher JL, Bergh J, et al. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell.* 2008;134:62-73.
- [80] Hill RP, Perris R. "Destemming" cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(19):1435-40.
- [81] Morán Mendoza E, Rodríguez Gallegos J, Lara Lozano M, Piña Leyva C, Thompson Bonilla MR, González Barrios JA, et al. Células tumorales circulantes en cáncer de mama: Un posible riesgo biológico. *Rev Esp Med Quir.* 2014;19(1):45-51.
- [82] Séronie-Vivien S. Circulating tumor cells: a new challenge for laboratory medicine. *Ann Biol Clin.* 2014;72(2):153-77.
- [83] Bednarz-Knoll, N. Alix-Panabieres, C. Pantel, K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2011;13:228.
- [84] Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: Transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLOS ONE.* 2012;7:e33788.
- [85] Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa. et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat. Med.* 2011;17:1101-1108.
- [86] Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(10):1579-90.
- [87] Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:5701-10.
- [88] Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers (Basel).* 2014;6(4):2369-86.

- [89] Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*. 2005;92:906-12.
- [90] Kanwar N, Hu P, Bedard P, Clemons M, McCreedy D, Done SJ. Identification of genomic signatures in circulating tumor cells from breast cancer. *Int J Cancer*. 2014:29399.
- [91] Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin N, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF. Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology*. 2007;25:5287-5312.
- [92] Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki M, Bolonak Ii, Stathopoulou A, et al. Predictive and Prognostic Value of Peripheral Blood Cytokeratin-19 mRNA-Positive Cells Detected by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Node-Negative Breast Cancer Patients. *Nature*. 2006;24:3756-3762.
- [93] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351:781-791.
- [94] Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:9393-9398.
- [95] Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014;345:216-220.
- [96] Toy W, Shen Y, Won H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45:1439-1445.
- [97] Robinson DR, Wu YM, Vats P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45:1446-1451.
- [98] Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013;31:539-544.
- [99] Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. 2014;20:897-903.
- [100] Pantel K, Alix-Panabières C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. *Ecollection*. 2014;3:584.
- [101] Moller EK, Kumar P, Voet T, Peterson A, Van Loo P, Mathiesen RR, et al. Next-generation sequencing of disseminated tumor cells. *Front Oncol*. 2013;3:320.
- [102] Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer*. 2005;103:884-891.
- [103] Abdel-Rahman O. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in iodine-refractory differentiated thyroid carcinoma (DTC): From bench to bedside. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014.
- [104] Deng G, Krishnakumar S, Powell AA, Zhang H, Mindrinos MN, Telli ML, Davis RW, Jeffrey SS. Single cell mutational analysis of PIK3CA in circulating tumor cells and metastases in breast cancer reveals heterogeneity, discordance, and mutation persistence in cultured disseminated tumor cells from bone marrow. *BMC Cancer*. 2014;14:456.
- [105] Alshareeda AT, Soria D, Garibaldi JM, Rakha E, Nolan C, Ellis IO, Green AR. Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):23-37.
- [106] Ivković-Kapicl T, Panjković M, Nikolić I, Djilas-Ivanović D, Knezević-Usaj S. Expression of cytokeratins 5/6 and cytokeratin 17 in invasive breast carcinoma. *Vojnosanit Pregl*. 2012;69(12):1031-8.
- [107] Gorski JJ, James CR, Quinn JE, Stewart GE, Staunton KC, Buckley NE, Mcet al. BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(3):721-31.
- [108] Liu LP, Bai J, Wei Y, Qi XD, Si TC, Li W, Pan H. Clinicopathologic features and immunohistochemistry of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. 2013;42(2):101-5.
- [109] Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res*. 1999;59:3028-31.
- [110] Al Joudi FS Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res*. 2014;139(5):675-85.
- [111] O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Mammaglobin in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*. 2005;114:623-7.

- [112] **Sjodin A, Ljuslinder I, Henriksson R, Hedman H.** Mammaglobin and lipophilin B expression in breast tumors and their lack of effect on breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res.* **2008**;28:1493-8.
- [113] **Pattabiraman N, Matthews JH, Ward KB, Mantile-Selvaggi G, Miele L, Mukherjee AB.** Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**;923:113-27.
- [114] **Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, Beex LV, Sweep FC.** Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol.* **2004**;22(4):691-8.
- [115] **Lin YC, Wu Chou YH, Liao IC, Cheng AJ.** The expression of mammaglobin mRNA in peripheral blood of metastatic breast cancer patients as an adjunct to serum tumor markers. *Cancer Lett.* **2003**;191(1):93-9.
- [116] **Shen C, Hu L, Xia L, Li Y.** The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem.* **2009**; 42(3):194-200.
- [117] **Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES.** Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem.* **2011**;57(3):421-30.
- [118] **Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Giannico A, Gorji N, Moroni M, Tozzini S, Pensa F, Gianquinto D, Fais F, Pronzato P, Fedeli F.** Relationship between human mammaglobin mRNA expression in breast cancer tissue and clinicopathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res.* **2006**;25(1):65-72.
- [119] **Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, Henrique R, Teixeira MR, Castedo S.** Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer.* **2004**; 108(4):592-5.
- [120] **Lewis GH, Subhawong AP, Nassar H, Vang R, Illei PB, Park BH, Argani P.** Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin. *Am J Clin Pathol.* **2011**; 135(4):587-91.
- [121] **Fernandez-Flores A.** Mammaglobin immunostaining in the differential diagnosis between cutaneous apocrine carcinoma and cutaneous metastasis from breast carcinoma. *Cesk Patol.* **2009**;45(4):108-12.
- [122] **Lopez-Bonet E, Pérez-Martínez MC, Martín-Castillo B, Alonso-Ruano M, Tuca F, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Vazquez-Martin A, et al.** Diagnostic utility of mammaglobin and GCDFP-15 in the identification of primary neuroendocrine carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* **2011**;126(1):241-5.
- [123] **Rollins-Raval M, Chivukula M, Tseng GC, Jukic D, Dabbs DJ.** An immunohistochemical panel to differentiate metastatic breast carcinoma to skin from primary sweat gland carcinomas with a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* **2011**;135(8):975-8
- [124] **Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J, Li L, Sturmoski M, Ellis M, et al.** Safety and preliminary evidence of biologic efficacy of a mammaglobin-a DNA vaccine in patients with stable metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* **2014**;20(23):5964-75.
- [125] **Yarden Y, Sliwkowski MX.** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2001**;2(2):127-37.
- [126] **Carraway KL, Cantley LC .** A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell.* **1994**; 78(1):5-8.
- [127] **Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS.** Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol.* **1999**;19(10):6845-57.
- [128] **Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JR, Farndon J, Wright C J.** Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *Steroid Biochem.* **1989**; 34(1-6):123-31.
- [129] **Vici P, Pizzuti L, Natoli C, Gamucci T, Di Lauro L, Barba M, et al.** Triple positive breast cancer: A distinct subtype? *Cancer Treat Rev.* **2014**.
- [130] **Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JM, Harper ME, et al.** Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology.* **2003**; 144: 1032-1044.

- [131] **Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al.** Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res.* **2008**;68:826-833.
- [132] **Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al.** Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **2004**; 96: 926-935.
- [133] **Nahta R, O'Regan RM.** Therapeutic implications of estrogen receptor signaling in HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* **2012**;135:39-48.
- [134] **Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH.** Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost.* **2007**; 5:632-634.
- [135] **Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al.** A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *N Engl J Med.* **2005**;353:793-802.
- [136] **Kats-Ugurlu G, et al.** Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol.* **2009**;219:287-293.
- [137] **Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP.** Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* **2003**;63:3805-3811.
- [138] **Fidler, I. J.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev. Cancer.* **2003**;3:453-458.
- [139] **Yokota, J.** Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis.* **2000**;21,497-503.
- [140] **Yang, J. et al.** Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumour metastasis. *Cell.* **2004**;117,927-939.
- [141] **Bernards R, Weinberg RA.** A progression puzzle. *Nature.* **2002**;418,823.
- [142] **Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR.** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genet.* **2003**;33,49-54.
- [143] **Chambers AF, Groom A C, MacDonald IC.** Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer.* **2002**;2,563-572.
- [144] **Cavallaro U, Christofori G.** Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* **2004**;4(2):118-32.
- [145] **Berx G, Van Roy F.** Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2009**;1(6).
- [146] **Coghlin C, Murray GI.** Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J. Pathol.* **2010**;222,1-15.
- [147] **Gerhardt H, Semb H.** Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J. Mol. Med.* **2008**;86,135-144.
- [148] **Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **2010**;141,52-67.
- [149] **McCawley LJ, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med.* **2000**:149-156.
- [150] **Boulay A, Masson R, Chenard MP, Elfahime M, Cassard L, Bellocq JP, Set al.** High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* **2001**.61:2189-2193.
- [151] **Chow MT, Luster AD.** Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol Res.* **2014**;2(12):1125-1131.
- [152] **Perry JK, Kannan N, Grandison PM, Mitchell MD, Lobie PE.** Are trefoil factors oncogenic?. *Endocrinol Metab.* **2008**;19(2):74-81.
- [153] **Reidick C, El Magraoui F, Meyer HE, Stenmark H, Platta HW.** Regulation of the Tumor-Suppressor Function of the Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase Complex by Ubiquitin and SUMO. *Cancers (Basel).* **2014**;7(1):1-29.
- [154] **Tsang JY, Hui SW, Ni YB, Chan SK, Yamaguchi R, Kwong A, Law BK, Tse GM.** Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* **2014**;143(1):1-9.
- [155] **Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, Jin CG, Wang XC.** Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers.* **2010**;25(2):59-68.

- [156] **Vallis KA, Reilly RM, Scollard D, Merante P, Brade A, Velauthapillai S, et al.** Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (111)In-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. **2014**;4(2):181-92.
- [157] **Norton JD.** ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci*. **2000**;113:3897-905.
- [158] **Manrique I, Nguewa P, Bleau AM, Nistal-Villan E, Lopez I, Villalba M, et al.** The inhibitor of differentiation isoform Id1b, generated by alternative splicing, maintains cell quiescence and confers self-renewal and cancer stem cell-like properties. *Cancer Lett*. **2015**;359:899-909.
- [159] **Wazir U, Jiang WG, Sharma AK, Newbold RF, Mokbel K.** The mRNA expression of inhibitors of DNA binding-1 and -2 is associated with advanced tumour stage and adverse clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res*. **2013**;33(5):2179-83.
- [160] **Ling MT, Wang X, Zhang X, Wong YC.** The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation*. **2006**;74(9-10):481-7.
- [161] **Jaafar H, Sharif SE, Murtey MD.** Pattern of collagen fibers and localization of matrix metalloproteinase 2 and 9 during breast cancer invasion. *Tumori*. **2014**;100(5):e204-11.
- [162] **Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, et al.** Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. **2000**;85(1):14-20.
- [163] **Cheng S, Lovett DH.** Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol*. **2003**;162(6):1937-49.
- [164] **Xu K, Wang L, Shu HK.** COX-2 overexpression increases malignant potential of human glioma cells through Id1. *Oncotarget*. **2014**;5(5):1241-52.
- [165] **Sicking I, Rommens K, Battista MJ, BÄühm D, Gebhard S, Lebrecht A, et al.** Prognostic influence of cyclooxygenase-2 protein and mRNA expression in node-negative breast cancer patients. *iBMC Cancer*. **2014**;14:952
- [166] **Elek J, Pinzon W, Park KH, Narayanan R.** Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res*. **2000**;20(1A):53-8.
- [167] **Ouyang Q, Gong X, Xiao H, Zhou J, Xu M, Dai Y, Xu L, Feng H, Cui H, Yi L.** Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Mol Cancer*. **2015**;14(1)
- [168] **Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souazé F, Plu-Bureau G, Chaouat M, et al.** The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One*. **2009**;4(1):e4223.
- [169] **Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, et al.** Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget*. **2014**;5(18):8252-69.
- [170] **Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al.** Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. **2005**;436(7050):518-24.
- [171] **Gupta GP, Perk J, Acharyya S, de Candia P, Mittal V, Todorova-Manova K, et al.** ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2007**;104(49):19506-11.
- [172] **Han H, Yang S, Lin SG1, Xu CS, Han ZH.** Effects and mechanism of downregulation of COX 2 expression by RNA interference on proliferation and apoptosis of human breast cancer MCF 7 cells. *Mol Med Rep*. **2014**;10(6):3092-8.
- [173] **Castillo-Rodríguez RA, Arango-Rodríguez ML, Escobedo L, Hernandez-Baltazar D, Gompel A, Forgez P, et al.** Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice. *PLoS One*. **2014**;9(5):e97151.
- [174] **Vanharanta S, Massagué J.** Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. **2013**;24(4):410-21.

© Copyright 2014-2015 Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional “1º de Octubre”, ISSSTE.

Tesis escrita en: L^AT_EX 2_εpor: **Esmeralda Morán Mendoza.**

<http://www.debian.org/>

✉ esme_m217@hotmail.com

☎ Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM. Batalla 5 de Mayo s/n esquina Fuerte de Loreto. Colonia Ejército de Oriente

<http://www.zaragoza.unam.mx>



ISSSTE
INSTITUTO DE SEGURIDAD
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

Hospital Regional "1° de Octubre"
Laboratorio de Medicina Genómica
Proyecto de Investigación Aplicada

Identificación de células tumorales circulantes
de cáncer de mama en mujeres clínicamente
sanas que acuden a donar sangre



*Por un diagnóstico temprano
del cáncer de mama*

Tú puedes ayudar donando un poco de tu sangre



Informes: Hospital Regional “1° de Octubre”; Dra. María del Rocío Thompson Bonilla, Dra. Guillermina Rosas Sandoval, QFB. Jorge Rodríguez Gallegos, QFB. Esmeralda Morán Mendoza y Dr. Juan Antonio González Barrios al Tel: 51415300 Ext. 16610 y 16605