



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



***Origen y Perfil molecular de Células TumORAles Circulantes
de Cáncer de mama detectadas en la etapa subclínica.***

TESIS QUE PRESENTA:

Jorge Rodríguez Gallegos

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

Tutor Interno:

Dra. Raquel Retana Ugalde

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

Tutor Externo:

Dra. María del Rocío Thompson Bonilla

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	V
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Cáncer de mama	3
2.1.1. Factores de riesgo	3
2.1.2. Epidemiología	4
Internacional	4
Nacional	5
2.1.3. Diagnóstico de cáncer de mama	6
Examen clínico	7
Estudios de imagen	8
Ultrasonido	8
Mastografía	8
Mastografía de tamizaje:	9
Mastografía diagnóstica:	9
Tomografía por Resonancia Magnética	9
2.1.4. Clasificación histopatológica (Anatomía Patológica).	10
2.2. Histología de la mama	15
2.2.1. Estructura microscópica	17
2.2.2. Desarrollo de la mama	18
2.3. Clasificación molecular del cáncer de mama.	18
2.4. Genes marcadores de origen celular.	19

2.4.1. Marcadores de origen para CaMa de tipo Basal	19
KRT17	19
ITG β 4	19
LAM β 1	21
C-KIT	22
ITG α 6	23
MTX1	23
FABP7	24
EGFR	25
CDH3	26
NF κ β 1	27
2.4.2. Marcadores de origen para CaMa de tipo Luminal.	28
ESR1	28
FOXA1	29
GATA3	31
KRT8	32
KRT18	33
TFF3	33
XBP1	34
2.4.3. Marcadores de origen para CaMa tipo HER2(+).	35
HER2	35
GRB7	37
2.4.4. Marcadores de origen para CaMa tipo Triple Negativo	38
BIRC5	38
KRT5	39
3. Planteamiento del problema	40
4. Hipótesis	41
5. Objetivos	42
5.1. General	42
5.2. Específicos	42
6. Metodología	43
6.1. Tipo de estudio	43
6.2. Población de estudio	43
6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	43
6.3.1. Inclusión	43
6.3.2. Exclusión	43

6.3.3. Eliminación	44
6.4. Metodología experimental	44
6.4.1. Fase Pre-experimental	44
Determinación del tamaño de la muestra	44
Obtención del consentimiento informado y la muestra sanguínea	44
6.4.2. Fase Experimental	45
Separación de células nucleadas (Ficoll-Paque)	45
Extracción de RNA total mediante TriZol®	45
Cuantificación de RNA obtenido (Espectrofotometría)	46
Electroforesis en Gel de agarosa	47
Retrotranscripción (mRNA → cDNA)	47
Verificación de la Retrotranscripción (PCR de β -actina)	48
PCR en tiempo real (RT-PCR), Panel básico de detección de CTCs (Marcadores: CK-17, Mammaglobina A y HER2)	48
PCR en tiempo real (RT-PCR), Panel ampliado de Origen tumoral	50
7. Resultados	51
8. Discusión de resultados	57
8.1. Detección de Células tumorales circulantes	57
Mamaglobina-A	57
Citoqueratina 17 (CK-17)	58
HER2	58
8.2. Determinación de origen molecular	59
8.2.1. Panel de detección correspondiente a cáncer de mama subtipo Luminal	60
ESR1	60
FOXA1	60
GATA3	61
TFF3	61
XBP1	61
KRT8 y KRT18	62
8.2.2. Panel de detección correspondiente a cáncer de mama subtipo Basal	62
LAMB1	63
KRT5	63
KRT17	63
FABP7	63
ITG β 4 e ITG α 6	64
Panel de detección correspondiente a cáncer de mama Triple Negativo	65
9. Conclusiones	66

10.Perspectivas	67
Bibliografía	68
Appendices	75
A. Carta de consentimiento informado	75
B. Cartel para difusión del Proyecto	79
C. Artículo de Revisión	80
D. Protocolos de trabajo	88
D.1. Protocolo de extracción de RNA de células nucleadas	89
D.2. Protocolo de Retrotranscripción	90
D.3. Protocolo de PCR en Tiempo Real para β -actina	91
D.4. Protocolo de PCR en tiempo real para el panel de detección de CTCs	92

Lista de Figuras

Figura	Título	Página
2.1.	Incidencia de Cáncer de mama en México	6
2.2.	Anatomía de la mama normal	16
2.3.	Estructura del Gen de CK17	19
2.4.	Estructura del Gen de ITG β 4	20
2.5.	Estructura del Gen de LAM β 1	21
2.6.	Estructura del Gen de C-KIT	22
2.7.	Estructura del Gen de ITG α 6	23
2.8.	Estructura del Gen de MT1X	24
2.9.	Estructura del Gen de FABP7	24
2.10.	Estructura del Gen de EGFR	25
2.11.	Estructura del Gen de CDH3	26
2.12.	Estructura del Gen de NF κ β 1	27
2.13.	Estructura del Gen de ESR1	28
2.14.	Estructura del Gen de FOXA1	30
2.15.	Estructura del Gen de GATA3	31
2.16.	Estructura del Gen de KRT8	32
2.17.	Estructura del Gen de KRT18	33
2.18.	Estructura del Gen de TFF3	34
2.19.	Estructura del Gen de XBP1	35
2.20.	Estructura del Gen de HER2	36
2.21.	Estructura del Gen de GRB7	37
2.22.	Estructura del Gen de BIRC5	38
2.23.	Estructura del Gen de KRT5	39
6.1.	Protocolo de RT-PCR para el Panel Básico de detección de CTCs	49
7.1.	Patrón de corrimiento electroforético	52

7.2. Panel de identificación	53
7.3. Panel de origen tumoral (Subtipo Basal)	55

Lista de Cuadros

Cuadro	Título	Página
2.1.	Localización del tumor y subtipo histológico relacionado	15
7.1.	Muestras estudiadas	51
7.2.	Fenotipos de las muestras positivas a cáncer de mama	54
7.3.	Marcadores del Panel Ampliado (Origen Tumoral)	54
7.4.	Resultados de expresión de los marcadores de Origen Tumoral	56

Este trabajo está dedicado a:

Mis padres,
por que ni éstas páginas ni yo existiríamos de no ser por ellos.

Mis hermanos (Giovanna y Esteban),
esperando que encuentren su propio camino y vivan de acuerdo a él.

Al profesor Pedro,
que me permitió retar y superar mis límites.

A mis amigos,
por estar ahí... incluso cuando yo aún no llegaba ;)

A las donadoras y pacientes con cáncer de mama,
para que se mantengan firmes, no están solas.

Agradecimientos

Este trabajo no habría podido terminarse sin el apoyo de mucha gente, que intervino en él tanto de forma directa e indirecta.

Para empezar: el Dr. Juan Antonio Gonzales Barrios, de quien partió la idea original y me enseñó a dominar las técnicas de biología molecular, ayudándome a entender los fundamentos teóricos del proyecto y quien me empujó a salir de mi zona de confort.

Mi directora de tesis, la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla quien me dio la oportunidad de entrar al proyecto y me enseñó que la labor científica también requiere de habilidades sociales para desarrollarse completamente.

A mi asesora interna, la Dra. Raquel Retana Ugalde quien tuvo paciencia y disposición para ayudarme en aquellos momentos donde la frustración me puso de cabeza.

A mis Padres, quienes jamás perdieron la seguridad de que terminaría con esto aún cuando en ocasiones yo mismo lo dudé, que tuvieron la paciencia para seguir impulsándome y que desde siempre han estado respaldándome, aún cuando nuestras opiniones no siempre coincidieron.

A mis amigos: Pignon, Yadira, Esmeralda, Abigail, Manuel, Hayde, Victor y Marilyn, que en algunos casos fueron lectores beta, correctores y traductores. y quienes a lo largo de estos años han estado ahí para darme una mano, un nuevo punto de vista, consejos, muchas risas y que evitaron que dejara de creer en mí.

A mis profesores que a lo largo de mi formación, han sido protagonistas en mi desarrollo, permitiéndome avanzar gracias a los conocimientos que me transfirieron.

Al ISSSTE, por permitirme trabajar en sus instalaciones y abrir poco a poco oportunidades para el desarrollo de investigación.

A la UNAM, por ser el núcleo de mi crecimiento académico, darme mi primer acercamiento a la investigación científica, esperando que crezca como institución y tome el lugar que le corresponde como pilar de crecimiento académico, científico y social.

Y a las donadoras que participaron en este proyecto, mujeres valientes sin las cuales nada de esto tendría sentido.

A todos: **Gracias...**

Resumen

En el 2001 se clasificó al cáncer de mama como el tipo de tumor con mayor incidencia y la principal causa de muerte por neoplasias reportado en mujeres; sin embargo, pese al mal pronóstico que representa puede ser controlado o erradicado si su detección se realiza de manera temprana. En países en vías de desarrollo como lo es México, existe una elevada tasa de mortalidad debido a que: **a)** el diagnóstico del cáncer de mama es deficiente, reportándose casos en estadios avanzados lo que repercute directamente en el pronóstico de las pacientes por la reducción en la efectividad del tratamiento, **b)** por posibles recidivas, **c)** por el desarrollo de tumores secundarios, **d)** por la alta capacidad de invasión del tumor primario e incluso **e)** por la elevada probabilidad de metástasis.

En la actualidad, los métodos de diagnóstico más utilizados son los de la autoexaminación y la mastografía, no obstante estos métodos solo son efectivos cuando el tumor alcanza un tamaño de 2cm, es decir, cuando el riesgo para la paciente ya es elevado. Dado a lo anterior, en el Servicio de Medicina Genómica perteneciente al Hospital Regional “1º de Octubre” del ISSSTE proponemos un protocolo experimental para el desarrollo y validación de un método de diagnóstico que es temprano, de alta sensibilidad, de alta especificidad y de baja invasividad; basado en la detección de perfiles de expresión genética de Células Tumorales Circulantes (CTCs) de cáncer de mama y que además clasificará al tumor de acuerdo a su origen celular, lo cual permitirá elegir las medidas terapéuticas más convenientes.

Se recolectaron 1,504 muestras de mujeres clínicamente sanas de un rango de edad de 18 a 65 años que acudieron a donar sangre al servicio de Banco de Sangre del Hospital. La selección de las pacientes como “aptas para donar” se realizó bajo el criterio de la NOM-253-SSA1-2012 por el servicio de Banco de Sangre y solo se procesaron las muestras de las pacientes que aceptaron participar en el protocolo de investigación mediante la firma de la carta de consentimiento informado.

El procesamiento de la muestra se realizó al concentrar la fracción del paquete leucocitario mediante un gradiente de densidad por Ficoll-Paque y la extracción subsecuente del RNA con TRIzol®. Posteriormente, la evaluación de expresión génica

se realizó por el protocolo RT-qPCR. Las muestras se determinaron positivas a CTCs cuando expresaban los transcritos de los genes de HER2, CK17 y MAM-A, a éstas se les realizó el procesamiento de un segundo panel de 26 genes para determinar el origen celular.

De las 1504 muestras recolectadas se dectaron 11 que fueron positivas al panel de tamizaje y que se sometieron al panel de clasificacion molecular, dando como resultado su categorización dentro del grupo molecular “Luminal”, 10 pertenecen al grupo “Luminal A” y una al grupo “Luminal B”. Adicional a la clasificación se obtuvo información util acerca del pronóstico del desarrollo del tumor y la respuesta a las opciones terapéuticas

Abstract

Since 2001, breast cancer has been classified as the tumor with the highest incidence and main death cause for women, however, despite of the bad prognosis that it represents, breast cancer can be controlled or eradicated if it is early detected. On developing countries such as Mexico, there exist a high mortality rate caused by breast cancer due to a deficient diagnosis, on advanced grades of cancer which has a repercussion on patient prognosis by the low treatment efficiency as the presence of secondary tumors caused by recedives, the invasion capacity or for the probability of metastasis, which are high.

Currently, the most used methods for diagnosis are self-exploration and mastography, but these methods are effective when the tumor reaches a size of about 2 cms, that is when the death risk is increased. For these reasons, in the Genomics Medicine Service of the “1° de Octubre” Regional Hospital, that belongs to ISSSTE, we propose an experimental protocol for the developing and validation of a new method of diagnosis that is early, sensible, specific and low invasive; based on the gene expression patterns of breast cancer “Circulating Tumor Cells” (CTCs) and it also allows classify tumor in base of the cellular origin, which repercutes directly on the therapeutic management.

We recollected 1,500 samples from women clinically classified as healthy on the age range of 18 to 65 years that assist to Blood Bank Service of the Hospital. Donor patient selection was based on the criteria of the Blood Bank Service and we only processed the samples of patients that accepted participate in the investigation protocol when they signed the informed consent letter.

The sample procedure consist on the concentration of the leukocyte rich fraction by density gradient with Ficoll-Paque and the subsequent RNA extraction using TRIzol. After that, gene expression was evaluated by RT-qPCR assay. We determinate CTCs positive samples when they expressed HER2, CK17 y MAM-A genes, which were secondly processed by a 26 gene panel to determine its cellular origin.

Results show that from the sampled population, we detected the presence of CTCs markers on a total of 11 patients even on 20 years old; from these samples 10 proceed from “Luminal A” and 1 from “Luminal B” cellular origin. We concluded that our diagnosis

method is effective to diagnose CTC on periferic blood from clinically healthy young women population; additionally this diagnosis method can detect breast cancer on a subclinical grade which increases exponentially the patient prognosis, allowing to monitor the patient and provide an effective treatment in the least invasive tumor stages.

Introducción

Desde 2001 el cáncer de mama es la primera causa de las muertes de mujeres debidas a neoplasias a nivel mundial, ese mismo año, desplazó al cáncer cervicoutérino en índice de mortalidad, se presenta más frecuentemente después de los 40 años incrementando el riesgo de desarrollarlo en relación directa con la edad, además de presentarse en cualquier nivel socioeconómico, por lo tanto el cáncer de mama es considerado un problema social, económico y de salud pública nacional. En México el patrón epidemiológico es consistente con el modelo observado a nivel mundial, sin embargo en los últimos 6 años se han reportado casos en los que empieza a presentarse a edades más tempranas, habiendo reportes de mujeres menor de 25 años diagnosticadas con esta patología.

Hasta ahora, se sabe que la enfermedad es multifactorial, algunos factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama son: la edad, factores hereditarios, nuliparidad, antecedentes de patologías mamarias benignas y menopausia tardía; adicionalmente, se ha observado que factores externos como el consumo de alcohol, tabaquismo, terapia hormonal e inactividad física pueden aumentar el riesgo de padecer esta enfermedad. Dado que la mayoría de dichos factores son endógenos, la detección oportuna que consiste en la autoexploración y la revisión clínica en conjunto con la mastografía previenen el incremento de la mortandad cuando se administran los tratamientos de manera oportuna. Una limitante en nuestro país es la deficiencia en la divulgación promoviendo que los métodos de auto-cuidado y auto-exploración que adicionado a la falta de accesibilidad a los servicios de salud y/o a los recursos de detección necesarios.

En conjunto, esas limitantes provocan que en nuestro país, la detección tardía sigue siendo la regla y no la excepción, tal que el 40-50 % de los casos se presentan en los estadios III y IV, momento en que la probabilidad de éxito de una intervención es mucho más baja y los costos de atención son más altos. Se estima que, de no tomarse medidas adecuadas de detección y tratamiento oportunos, para 2020 en México ocurrirán 16531 casos nuevos de cáncer de mama.

Aunado a lo ya descrito, la propia heterogeneidad del cáncer hace que la elección de su tratamiento y el desarrollo posterior al diagnóstico del paciente sea altamente importante a la vez de complicado, requiriendo de métodos para la detección y clasificación de la patología que además tengan la flexibilidad y capacidad de identificar el cáncer en etapas tempranas y, de ser posible, sin ser excesivamente invasivas o arriesgadas.

Por lo anterior, en el laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional “1º de Octubre” del ISSSTE se llevó a cabo el proyecto de investigación para la detección y clasificación molecular de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas, del cual se desprende esta tesis y que tiene como objetivo desarrollar, estandarizar y validar un método de detección temprana de cáncer de mama con alta especificidad y confiabilidad, con el añadido de tener la capacidad para identificar el origen molecular de la población celular.

Se contó con la colaboración de la unidad del banco de sangre del hospital donde se entrevistó e informó a la población de mujeres donadoras acerca del proyecto, logrando la participación de 1504 mujeres catalogadas como *aptas para donación* de las cuales se recolectó, de manera posterior a la separación de las fases sanguíneas, la fracción leucocitaria que no se aprovecha para transfusiones.

La fracción leucocitaria se sometió a un proceso de separación celular mediante gradiente de densidades, centrifugando la muestra con ficoll, y recuperando únicamente las células nucleadas, de las que se obtuvo RNA total usando la metodología de extracción por TriZol. El RNA se verificó por electroforesis y se cuantificó mediante espectrofotometría de absorción.

El RNA fue sometido a una reacción de retrotranscripción para obtener cDNA de una sola cadena, que fue verificado mediante PCR de punto final con primers para el gen constitutivo de β -actina, posterior a lo cual se realizó una PCR en tiempo real con sondas TaqMan con un panel de tamizaje que incluyó los genes HER2, KRT17, SecA y GAPDH como gen constitutivo control.

Las muestras que resultaron positivas a la presencia de Células Tumorales Circulantes se sometieron a una PCR en tiempo real con un segundo panel de 26 genes, útil para la clasificación de origen de las Células Tumorales Circulantes, los genes incluyen algunos con capacidad de predicción y pronóstico del desarrollo de la enfermedad.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama, es una enfermedad compleja y heterogénea con una enorme cantidad de características biológicas y clínicas y sin un factor desencadenante claro.¹ Tiene dos sitios anatómicos de origen, siendo el primero en los lobulillos mamarios, que son las glándulas encargadas de la producción de leche; y el segundo en los ductos que conectan las lobulillos al pezón.² Varias modificaciones en el material genético se relacionan con cambios en el ciclo celular, evasión de la apoptosis y reingreso al ciclo celular confiriéndole inmortalidad y potencial replicativo ilimitado.³

2.1.1. Factores de riesgo

Se han asociado múltiples factores al riesgo de cáncer de mama tanto hereditarios como exógenos, a continuación se mencionan los más comúnmente admitidos, clasificados de acuerdo con su origen

Factores biológicos

- Sexo femenino
- Edad avanzada
- Antecedentes personales o familiares de cáncer de mama ¹
- Antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica.
- Vida menstrual con duración mayor a 40 años
 - Menarca antes de los 12 años

¹Los antecedentes familiares de cáncer de mama se asocian con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, describiéndose incrementos de 60-80% en mujeres que cuentan con un familiar de primer grado afectado por la patología

- Menopausia después de los 52 años
- Incremento de la densidad mamográfica
- Ser portador de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 ²

Factores Ambientales

- Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente durante el desarrollo

Factores asociados con Antecedentes reproductivos

- Nuliparidad
- Primer embarazo después de los 30 años
- Terapia hormonal durante más de 5 años

Factores asociados con estilo de vida

- Alimentación rica en carbohidratos pero baja en fibra
- Dieta rica en grasas trans
- Obesidad
- Sedentarismo
- Alcoholismo
- Tabaquismo

2.1.2. Epidemiología

Internacional A nivel mundial, el cáncer de mama es el segundo tipo más común en la población general, y por mucho, el más frecuentemente reportado en mujeres, con un estimado de 1.67 millones de casos nuevos reportados solo en 2012, lo que representa un 25 % de los casos totales de cáncer reportados ese año. Es la quinta causa general a nivel mundial de muertes debidas a neoplasia y la primera para el sexo femenino, con 522,000 defunciones registradas en 2012.⁴

Si bien el riesgo de enfermar es mayor en las mujeres de países con niveles socioeconómicos altos, se ha observado que el riesgo de muerte se dispara para las mujeres de los países pobres debido a que tienen menos posibilidades de acceder a los servicios de salud que permitan una detección y tratamiento oportunos, de manera tal, que el 70 % de las muertes reportadas por cáncer de mama ocurren en los países en vías de desarrollo.⁵

De todas las muertes por cáncer en el género femenino, en los países en vías de desarrollo el cáncer de mama representa el 6.4 % de las muertes y el 7.4 % del total de los años de

²Las mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2, p53 y AT se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama. Los casos más comunes se relacionan con las mutaciones de los genes supresores BRCA1 y BRCA2

vida saludable potencialmente perdidos (AVISA). Para los países con alto nivel económico el 7.5 % de todas las muertes son por cáncer y el 9.7 % del total de la pérdida de AVISA. En comparación con el cáncer cérvicouterino, el cáncer de mama representa una mayor proporción, tanto de las muertes como de la pérdida de AVISA, en ambos grupos de países, es decir, en los países de ingresos altos y en los de bajos ingresos.⁶

Nacional En México, desde el año 2006 el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas del género femenino y representa el 11.34 % de los casos reportados de cáncer, observándose un incremento anual del 1.5 %. El grupo etario más afectado, se encuentra entre los 40 y los 50 años de edad.⁷

En 2011, los principales tumores malignos detectados en la población mexicana que fue hospitalizada fueron de órganos genitales masculinos y femeninos (21.9%), de mama (18.9%) y de los órganos digestivos (18%). Si bien el cáncer de mama no se ubica entre los más frecuentes tipos de cáncer en hombres, se observa en 2 de cada 100 casos. Al contrario, en las mujeres, la morbilidad hospitalaria por neoplasias mas alta es debida al cáncer de mama (30 de cada 100 mujeres con cáncer), seguido por tumores en órganos genitales (24 de cada 100) y órganos digestivos (14 de cada 100).

Durante los últimos cuatro años, la incidencia de cáncer de mama en la población masculina de 20 años en adelante se ha mantenido relativamente estable, pasando de 0.40 en 2007 a 0.70 en 2011. En la población femenina, la tendencia es parecida, pero los valores aumentan en comparación con los hombres, ya que en 2007 se detectaron 22.09 casos nuevos por cada 100,000 mujeres a partir de los 20 años, que en 2011 se incrementaron 23.70.

En 2011, la incidencia más alta de neoplasias mamarias entre las mujeres de 20 años en adelante se ubica en la población de 60 a 64 años de edad con 61 casos nuevos por cada 100,000 mujeres, seguida de las mujeres de 50 a 59 años (51 casos por cada 100,000) y en las de 45 a 49 años (45 casos nuevos por cada 100,000).

Por entidad federativa, se observa que en 2011 los estados con el mayor número de casos nuevos de cáncer de mama son Veracruz (con 50.02 casos por cada 100,000 mujeres mayores a 20 años), Jalisco (55.91) y San Luis Potosí (41.44); mientras que en Guerrero, Quintana Roo y Guanajuato, la identificación de nuevos casos de cáncer de mama es muy baja (3.58, 5.25 y 7.32 por cada 100,000 mujeres respectivamente)⁸

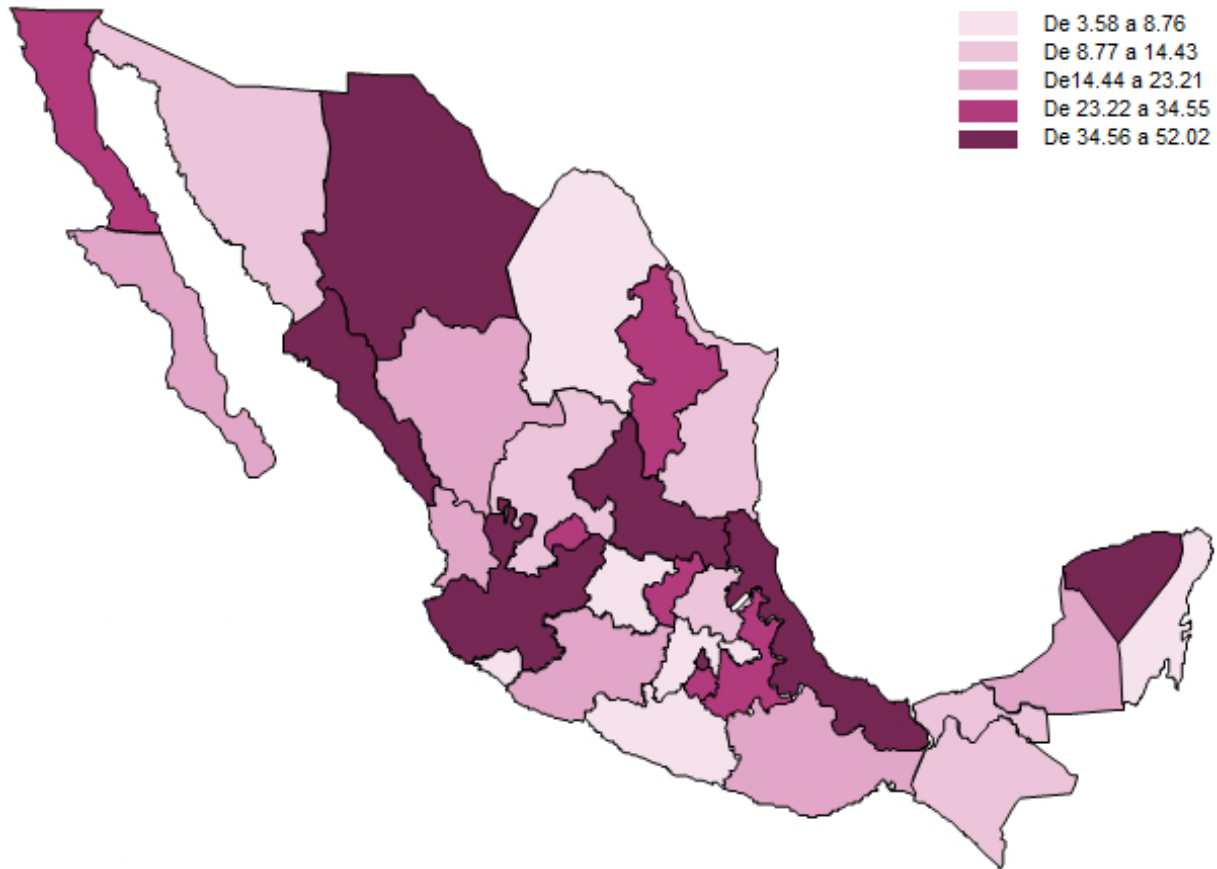


Figura 2.1: Incidencia de Cáncer de mama en mujeres mayores de 20 años en México: Datos por cada 100,000 mujeres.

Se utilizó la clasificación estadística de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Se excluyen los casos sin edad especificada

Fuente: SSA CEVANECE (2012). Anuarios de Morbilidad 1984-2011; y CONAPO (2013). Proyecciones de la población de México 2010-2050. Procesado por el INEGI.

Así, aun cuando México se ubica en un punto intermedio de las tasas de incidencia, el cáncer de mama es un problema de salud que año tras año cobra importancia debido a que sus tasas de incidencia y mortandad muestran continuos aumentos debido al envejecimiento de la población, el aumento de la prevalencia de los factores de riesgo y la falta de un programa nacional de detección oportuna integral, lo cual se hace invidente al observar que el 52 % de los diagnósticos de cáncer de mama se realizan en etapas tardías.⁵

2.1.3. Diagnóstico de cáncer de mama

En la mayoría de los casos, el cáncer de mama se presenta de manera subclínica en sus etapas iniciales, es decir, que sólo se puede detectar por estudios de imagen y en

menor proporción por una clínica básica que permite la detección de tumores palpables; sin embargo, también puede presentarse como un tumor no doloroso que, hasta en el 30 % de los casos se asocia con adenopatías axilares.⁷

Actualmente se cuentan con varias herramientas aprobadas para su uso en el diagnóstico del cáncer de mama, la Norma Oficial Mexicana *NOM-041-SSA2-2011 "Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama"*. Establece que: "Toda persona con sospecha de patología mamaria maligna por exploración clínica o mastografía de tamizaje, debe recibir una evaluación diagnóstica que incluye; evaluación clínica, estudios de imagen y en caso necesario la biopsia, mismas que deberán realizarse en un servicio especializado de patología mamaria que cumpla con la normatividad vigente..."⁹

Examen clínico

Es aquel examen de senos realizado por un profesional de la salud (médico o enfermera) en el que inicialmente se hace una exploración visual buscando anomalías en la forma o el tamaño de los senos, o bien, cambios en la piel de los senos y/o pezones; seguido de una palpación usando las yemas de los dedos, se debe poner especial atención a la forma y textura de los senos, localizando cualquier protuberancia y verificando si dicha protuberancia se encuentra adherida a la piel o a los tejidos profundos (una diferencia importante entre las tumoraciones de tipo benigno y maligno es que mientras las benignas son móviles, las malignas se encuentran fijas a la piel o al tejido adyacente). También hay que examinar el área de debajo de los brazos. Además, durante la exploración deben revisarse las cadenas ganglionares axilares, infravasculares y supraclaviculares.¹⁰

Aunado a lo anterior, el examen clínico incluirá la identificación de factores de riesgo en la historia clínica de la paciente, para determinar la edad a la que se debe recomendar el inicio de las mastografías y la posible necesidad de consejería en mujeres de alto riesgo.

Así, el diagnóstico presuntivo de patología mamaria maligna se puede establecer por un conjunto de signos clínicos compatibles con el cáncer de mama entre los que se incluyen:

- Detección de nodulación sólida, irregular, de consistencia dura, fija a tejidos profundos.
- Evidencia de cambios cutáneos (piel de naranja, retracción de la piel, lesiones areolares que no cicatricen aún con tratamiento).
- Zona de sistematización en el tejido glandular, localizado a una sola mama y región.
- Presencia de secreciones sanguinolentas.
- Observación de crecimiento axilar o supraclavicular.
- Aumento de la red venosa superficial.

De acuerdo a la décima revisión de la clasificación internacional de enfermedades, el

cáncer de mama se codifica como C50, código que corresponde a tumor maligno de mama. El examen clínico debe realizarse de manera anual a partir de los 25 años.^{9, 10}

Estudios de imagen

Se trata de técnicas que permiten observar directamente la existencia del tumor dentro de la mama sin la necesidad de una biopsia, la elección del estudio (mastografía, ultrasonido o la resonancia magnética) dependerá de la edad y la disponibilidad de los recursos, de preferencia, empezando entre los cinco y diez años antes del diagnóstico más precoz de cáncer de mama en la familia, sin embargo, hay restricción respecto a la edad que impide la realización de los estudios antes de los 25 años.⁹

Ultrasonido El ultrasonido es un método de imagen que, sin necesidad de hacer uso de radiaciones permite diferenciar la presencia de un tumor quístico o sólido en la mama.¹⁰

Usa el principio de emisión y recepción de ondas sonoras para proporcionar una imagen en tiempo real que se muestra en un monitor y de la cual es posible tomar fotografías; cabe mencionar que por norma, se debe realizar un ultrasonido de alta resolución usando un transductor lineal con una frecuencia de 7.5 MHz, estos aparatos logran identificar tumores con diámetro mínimo de 0.5cm, siendo incapaz de detectar estructuras menores como las microcalcificaciones existentes en un gran número de tumores malignos.^{9, 10}

En este estudio se observan con mayor frecuencia formaciones quísticas, cuya caracterización sonográfica está dada por nódulos dolorosos anecóicos o transcónicos que presentan líneas laterales finas de tamaños variables cuya forma depende de la cantidad de líquido que contengan. Sus limitantes excluyen al ultrasonido como opción viable para ser utilizado en los programas de detección de cáncer de mama, pero ocupa un papel importante como método auxiliar de diagnóstico en mujeres menores de 40 años y embarazadas, poblaciones en las que la mastografía no está indicada de manera rutinaria.¹⁰

Mastografía Se trata de un estudio de imagen de tipo radiográfico (emplea pequeñas dosis de rayos-x) que obtiene tomas desde distintos ángulos del seno para la búsqueda de anomalías tisulares pequeñas (menores a 5mm). Es la única herramienta de detección que ha demostrado disminuir la mortalidad por cáncer de mama ya que permite un diagnóstico temprano siempre y cuando sea practicada con cierto nivel de calidad en el ámbito de un sistema de detección.⁹

El equipo para la toma de las imágenes debe cumplir con las estipulaciones de la *NOM-229-SSA1-2002, Salud Ambiental. Requisitos técnicos para las instalaciones, responsabilidades sanitarias, especificaciones técnicas para equipos y protección radiológica en establecimientos de diagnóstico médico con rayos X.*⁹

Las imágenes se pueden obtener mediante dos alternativas: de manera análoga (donde el mastógrafo emplea un sistema pantalla-película, que hace necesario un equipo de revelado automático dedicado al mastógrafo); o de manera digital (a través de un sistema laser de alta resolución acoplado a detectores) siendo esta última opción la de mayor utilidad, ya que incrementa la detección de cáncer mamario incluso en mujeres con mamas densas.¹⁰

Una mastografía de rutina normalmente consiste en 2 tomas (vistas) de rayos X para cada seno, aunque algunas mujeres con senos grandes pueden necesitar más tomas a fin de cubrir una mayor cantidad de tejido posible.¹¹

Los resultados de la mastografía deben reportarse de acuerdo con la última Clasificación de BIRADS que está disponible en la página del Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

El sistema BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System, BI-RADS) fue creado en 1992 por el American College of Radiology como un lenguaje estándar para describir los hallazgos y los resultados de las mastografías.^{12, 13} Hay 7 categorías de BIRADS que van del 0 a 6, donde la categoría 0 es una evaluación incompleta cuyos hallazgos deben ser evaluados con ayuda de las demás herramientas de detección para poder recategorizarse en alguna de las demás categorías. El resto son categorías completas que implican una probabilidad creciente de malignidad y con sus propias recomendaciones de seguimiento.¹²

Además, las mastografías se pueden categorizar en dos grupos dependiendo del momento en el que se realicen:

Mastografía de tamizaje: Se practica en mujeres asintomáticas, se debe llevar a cabo de manera anual a partir de los 40 años, intervalo en el cual se apuesta por una detección oportuna del cáncer antes de que los síntomas se desarrollen. La mastografía de tamizaje y la fecha de próxima detección se deben registrar en la Cartilla nacional de Salud.⁹

Mastografía diagnóstica: Realizada como parte de la evaluación diagnóstica por un resultado de imagen sospechosa o en mujeres con síntomas clínicos de patología mamaria sospechosa de cáncer.⁹

Tomografía por Resonancia Magnética La resonancia magnética usa campos magnéticos para producir imágenes seccionales sumamente detalladas del cuerpo. Las tomografías de mama usan un medio de contraste (regularmente gadolinio DTPA), el cual se inyecta por vía intravenosa antes o durante el examen para mejorar la calidad y el detalle de las imágenes del tejido mamario.¹⁴

La resonancia magnética con gadolinio tiene una sensibilidad de 94-100 % pero una especificidad de 37-97 % y un valor predictivo positivo de 44 a 96 %.⁷ Este estudio es un

método complementario para el diagnóstico y no debe ser usado como reemplazo de la mastografía.¹⁴

2.1.4. Clasificación histopatológica (Anatomía Patológica).

Las lesiones malignas de la mama tienen una gran variedad de características anatómicas, y suelen clasificarse en función de éstas para facilitar su estudio y tratamiento (*Cuadro 2.1*).

Carcinomas *in situ* de mama. Los carcinomas de mama con localización *in situ* fueron reconocidos por primera vez a los inicios del siglo XX; se clasificaron morfológicamente como: células con citología similar a las de los carcinomas invasivos, pero anclados a las estructuras de origen.¹⁹

Desde 1973 existen estudios de las unidades ductolobulillares como un sitio anatómico común para el desarrollo de una gran diversidad celular de Cáncer de mama.²⁰

Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS). Actualmente, el término “carcinoma ductal” se refiere a patrones de proliferación celular anormal asociada con el compromiso predominante de los conductos verdaderos en la categoría de carcinoma *in situ* que tiene, un alto riesgo de recidiva local, si no se establece un tratamiento adecuado. Así pues, el CDIS es esencialmente un diagnóstico de exclusión, que abarca a cualquier lesión considerada como carcinoma *in situ* que no presente las características de una neoplasia lobulillar.²¹

El CDIS incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias no invasivas con morfologías diversas y riesgos variados de recidiva y de transformación invasora. Es probable que estas patologías se originen en la unidad ductolobulillar terminal, sin embargo suele extenderse y comprometer los conductos extralobulillares. Si se compara con el carcinoma lobulillar *in situ*, tiende a ser mas variable en su componente histológico, las células comprometidas muestran núcleos más grandes y pleomórficos con tendencia a formar microácinos, espacios cribiformes o estructuras papilares, dependiendo del tamaño de la lesión puede llegar a presentarse necrosis y, a veces, la periferia de las lesiones pueden incluir patrones que se confunden con la hiperplasia atípica.²² En general, las lesiones que afecten solo algunos espacios limitados por membrana y que midan menos de 2 a 3 en su diámetro mayor deben ser consideradas como hiperplasias con o sin atipia y no carcinoma *in situ*.²³

El CDIS ha sido clasificado en base en sus características estructurales, en comedoniano, cribiforme, papilar, sólido y micropapilar.²⁴ La clasificación convencional del CDIS cubre aproximadamente al 85 % de lo que se reconoce como: carcinoma ductal no invasor, sin embargo aún falta definir completamente algunos tipos poco frecuentes, tanto del punto de vista morfológico como en relación al riesgo.²⁵ Además hay algunos tipos especiales de CIDS con implicaciones particulares como:

Carcinoma ductal hipersecretor *in situ*. Estas lesiones no producen nódulos dentro de la mama, y a menudo muestran calcificaciones de tipo lobulillar de aspecto benigno ya que la secreción central es la que se calcifica. Los estudios de mastografía revelan patrones que delimitan los lobulillos en una zona específica de la mama. Esta patología suele presentarse de forma regional, pero no tiene la uniformidad de continuidad que se observa en la mayoría de las otras formas de carcinoma ductal *in situ*. Ésta fue descrita originalmente en 1984, y la caracterizaron por la dilatación quística de los espacios afectados.²⁶ En múltiples ocasiones se presenta con patrones llamativos de núcleos grandes que lindan con la luz, de la misma forma como se observa en los cambios hipersecretorios en el endometrio.²⁷

El diagnóstico de CIDS es extremadamente difícil, siendo prioritario reconocer la atipia en la biopsia y recomendar una vigilancia continua mediante mastografía. Por desgracia, las calcificaciones se pueden hallar junto a otras alteraciones benignas en la misma región, lo cual representa un problema para el seguimiento mastográfico.²⁸

Enfermedad de Paget del Pezón. La enfermedad de Paget se presenta de forma clásica y distintiva como una área ecematosa del pezón, esta puede ser sutil o evolucionar a una lesión secretante y con erosión evidente. El proceso subyacente es la población de la epidermis de la superficie del pezón con células epiteliales neoplásicas dispersas, a menudo, estas son idénticas a las de la lesión de CIDS en los conductos subyacentes.²⁹ En los casos avanzados, el proceso puede extenderse del pezón a la aréola e incluso a la piel adyacente. De ahí, que se utilicen los términos “cambio pagetoide” y “características pagetoides”, para lesiones en donde se intercalan un tipo celular dentro de otro en el interior de los conductos y los lobulillos de la mama. En general, la enfermedad de Paget se asocia con CIDS extenso en el interior de la mama.³⁰

Carcinoma papilar enquistado no invasor. Las lesiones de este carcinoma son limitadas y probablemente tengan su origen en la superficie residual de un papiloma intraductal que fue superado. El patrón de las lesiones está conformado por células muy altas parecidas a las que se observan en el adenoma vellosa del colon, que se caracterizan por tener núcleos grandes e hiper cromáticos, los cuales están presentes sin que se presente hiperplasia por encima de los pedículos fibrovasculares. Dentro de esta categoría se incluyen lesiones enquistadas y no invasoras.³¹

Carcinoma lobular *in situ*. Desde 1941 se conocen las lesiones proliferativas epiteliales no invasivas (*in situ*) acuñándose el término de “carcinoma lobular *in situ*” o (CLIS).³⁴ Para la definición y conceptualización de esta patología fue de suma importancia la caracterización de las unidades lobulares, dicha caracterización se obtiene mediante los criterios de: distensión, distorsión y represión de la población celular involucrada en la

patología.

Carcinomas Invasores (infiltrantes) de la mama.

Carcinoma Tubular. Se trata de un carcinoma invasivo de tipo especial cuya posibilidad de metástasis es baja siempre y cuando se encuentre en forma pura.³⁵ Presenta túbulos angulados característicos compuestos por células con núcleos de bajo grado, dichos túbulos se disponen al azar y a menudo se infiltran entre las estructuras sanas adyacentes. En la mastografía se observa una masa espiculada que puede o no tener microcalcificaciones asociadas, se aprecia también cierta disminución asimétrica en la densidad mamaria, y deformación de la arquitectura de la mama acompañada por calcificaciones.³⁶

En la detección sistemática, el carcinoma tubular representa el 9% de todos los carcinomas y el 5% de la incidencia de los carcinomas invasores³⁷ y suele presentarse en pacientes de edad avanzada. Por lo general la supervivencia de las pacientes con este tipo de carcinoma es superior a los 15 años independientemente del tamaño del tumor.³⁸

Carcinoma cribiforme invasor. Esta patología tiene una estrecha relación con el carcinoma tubular, infiltra el estroma formando islotes de células cancerosas de tamaño uniforme repartidos a intervalos regulares.³⁹ Cerca de una cuarta parte de los casos de carcinoma cribiforme invasor presenta áreas entremezcladas de carcinoma tubular que no afecta al pronóstico final del paciente ya que, para ambos tipos de carcinoma el pronóstico es excelente. Incluso, la presencia de uno o dos ganglios linfáticos axilares con infiltración positiva no refleja efectos desfavorables en la supervivencia.⁴⁰

Carcinoma Mucinoso. La principal característica histológica del carcinoma mucinoso consiste en la formación de lagos de mucina extracelular en los que los agregados de tumor de bajo grado se encuentran suspendidos.⁴¹ Dependiendo de si se presenta en forma pura o mixta, los márgenes obtenidos por mastografía pueden ser diferentes: El carcinoma mucinoso puro presenta un contorno lobular circunscrito, que corresponde con los lagos de mucina extracelular observados en el estudio de histología; por otro lado, en su forma mixta se observan contornos mastográficos irregulares y mal definidos, lo que correspondería a la interfaz entre el carcinoma invasor y la estroma fibrótica que se apreciarían en la histología.⁴²

Si se presenta en su forma pura, este carcinoma tiene un pronóstico muy favorable en el que el 90% de los pacientes cuentan con una supervivencia superior a los 10 años,⁴¹ incluso sin la administración de quimioterapia adyuvante.⁴³

Carcinoma lobular infiltrante. Este carcinoma tiene dos características distintivas: la citología y su patrón de infiltración. En su forma clásica está compuesto por células pequeñas con núcleos regulares, redondos y lisis, y con luces intracitoplasmáticos

aisladas.⁴⁴ Las células infiltran en una sola línea y suelen rodear otras estructuras existentes generando un patrón parecido a una “diana de tiro”. El diagnóstico de la forma clásica del carcinoma lobular infiltrante se confirma cuando aparecen estas dos características juntas. Esta es la forma del carcinoma lobular infiltrante que se asocia frecuentemente al carcinoma lobular *in situ* (**Carcinoma lobular invasivo con componente predominante *in situ***). La propiedad infiltrante de este carcinoma es otorgada por mutaciones en la molécula de cadherina E de adhesión celular, lo que hace que el patrón de crecimiento carezca de una adecuada cohesión intercelular.⁴⁷ La variante clásica del carcinoma lobular invasivo tiene un pronóstico intermedio en el que el 80 % de los pacientes tienen una supervivencia de 5 años.³⁹

Se han descrito algunas variantes del carcinoma lobular invasivo (Sólida, alveolar, mixta y pleomórfica) en las cuales solo están presentes las características citológicas o bien el patrón de infiltración. En la variante *pleomórfica* se mantiene el patrón de infiltración (crecimiento en una sola hilera) pero las características celulares son demasiado variadas. Esta variante presenta un comportamiento agresivo.⁴⁵ La variante *sólida* del carcinoma lobular infiltrante también cuenta con un pronóstico poco favorable para el paciente.⁴⁶ El carcinoma lobulillar infiltrante suele ser multifocal y bilateral, sobre todo cuando se presenta la variante pleomórfica,⁴⁸ lo que guarda escasa relación con la probabilidad de supervivencia tras el tratamiento conservador.⁴⁹

Carcinoma Medular. El carcinoma medular tiene manifestaciones mastográficas, clínicas y patológicas características. Se presenta frecuentemente en los casos de cáncer de mama hereditario presente en mujeres con riesgo debido a mutaciones en el gen supresor BRCA1.⁵⁰

Macroscópicamente tiene una consistencia uniforme y blanda. Histológicamente presenta islotes de células tumorales con bordes irregulares, sin extremos agudos que se suelen interconectar formando un patrón de crecimiento sincial. Estos islotes no invaden el tejido mamario adyacente pero si ejercen presión contra el, lo que resulta en una lesión de bordes lisos y salientes que se reflejan en la mastografía como una masa bien circunscrita rodeada de tejido mamario normal.³⁹

El carcinoma medular presenta núcleos grandes y pleomórfos, con una cromatina aglutinada, frecuentemente se observan nucléolos y figuras mitóticas. En ocasiones se pueden presentar infiltrados importantes de linfocitos y plasmocitos en el tejido conectivo laxo que se encuentra entre los islotes celulares. Todas estas características se han asociado de manera individual a mutaciones de BRCA1.⁵¹ El pronóstico del carcinoma medular con ganglio centinela negativo tiene un buen pronóstico; en caso de que el ganglio centinela resulte positivo, el pronóstico no es claro y se requiere de monitoreo constante incluso después del tratamiento quirúrgico.⁵²

Carcinoma metaplásico. Bajo este término se abarca un grupo de tumores con características tanto epiteliales como mesenquimatosas. Su componente mesenquimatoso puede mostrar diferenciación escamosa, fusiforme, cartilaginosa u ósea. A través de un análisis estructural e inmunohistoquímico, se pudo demostrar que las áreas sarcomatoides tenían su origen en el tejido epitelial. Este tipo de tumores es sumamente infrecuente, y su pronóstico depende del estadio tumoral en que se encuentre la paciente^{53,54}.

Cuadro 2.1: Localización del tumor y subtipo histológico relacionado¹⁵⁻¹⁸

Localización del tumor	Subtipo Histológico
Carcinoma, NOS	
Ductal	Intraductal (in situ)
	Invasivo con componente predominante
	Invasivo NOS
	Comedón
	Inflamatorio
	Medular con infiltrado linfocitario
	Mucinoso (coloide)
	Papilar
	Escirroso
	Tubular
Otros	
Lobular	Invasivo con componente predominante in situ
	Invasivo
Pezón	Enfermedad de Paget NOS
	Enfermedad de Paget con carcinoma intraductal
	Enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasivo
Otros	Carcinoma indiferenciado
	Metaplásico

NOS = No especificado

2.2. Histología de la mama

La mama se encuentra ubicada en la fascia superficial de la pared torácica anterior y contiene de 15 a 20 lóbulos de tejido glandular de tipo tubuloalveolar, que se mantienen

en su lugar mediante un sistema de soporte formado a partir del tejido fibroso, mientras que el tejido adiposo rellena los espacios que quedan libres.⁵⁵

Cada lóbulo de la glándula mamaria termina en un conducto galactóforo que se abre a través de un orificio en el pezón. Debajo de la aréola cada conducto posee una zona dilatada denominada *seno galactóforo*.

La glándula está rodeada por tejido conectivo subcutáneo el cual se extiende en forma de compartimientos entre los lóbulos y lobulillos de manera que ofrece sostén a los componentes de la glándula sin encapsular individualmente cada uno de ellos. Los engrosamientos fibrosos del tejido conectivo forman interdigitaciones entre el tejido parenquimatosos de la mama, que se extienden desde la capa profunda de la fascia superficial y se fijan a la dermis. Estas estructuras reciben el nombre de “Ligamentos de Cooper”, se insertan de forma perpendicular con respecto a las capas de la fascia superficial de la dermis (corion), así, otorgan cierta movilidad al complejo mamario al mismo tiempo que le proporcionan sostén. Hay que acotar que la mitad superior de la mama y, específicamente, el cuadrante superior externo, contiene más tejido glandular que el resto de la mama.

Por medio de cirugía se puede identificar un espacio separado, la “bolsa retro-mamaria”, presente sobre la capa posterior de la mama entre la capa profunda de la fascia superficial y la fascia profunda que reviste el músculo pectoral mayor y los músculos vecinos del tórax. La bolsa retro-mamaria contribuye a la movilidad de la mama sobre la pared torácica.²⁵

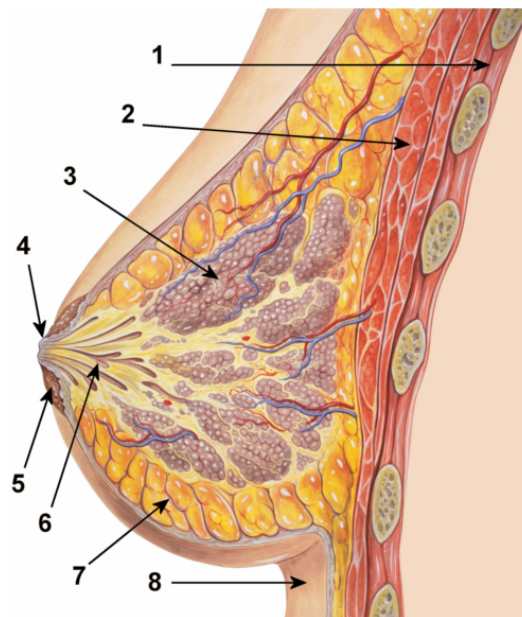


Figura 2.2: Anatomía de la mama. Vista de un corte sagital de la mama y la pared torácica adyacente (1) Músculos intercostales, (2) Músculo pectoral mayor, (3) Lobulillo de la glándula, (4) Pezón, (5) Aréola, (6) Seno galatóforo, (7) Tejido adiposo subcutaneo, (8) Epidermis

La mama adulta se extiende hacia abajo desde la segunda o tercera costilla hasta el pliegue inframamario que se encuentra sobre la sexta o séptima costilla, y hacia la parte externa desde el borde lateral del esternón hasta la línea axilar anterior.

La epidermis del pezón y la aréola está altamente pigmentada y algo arrugada. El pezón está revestido por un epitelio espinocelular estratificado y queratinizado. La superficie profunda de la epidermis contiene numerosas papilas dérmicas extraordinariamente largas que permiten a los capilares conducir la sangre a los vasos de la superficie, lo que confiere un color rosado a esta región en las mujeres jóvenes de piel clara.

La aréola contiene glándulas sebáceas, sudoríparas y areolares accesorias con una estructura intermedia entre las glándulas areolares verdaderas y las sudoríparas. Las glándulas areolares accesorias producen pequeñas elevaciones en la superficie de la aréola. Las glándulas sebáceas y las sudorípara se localizan a lo largo del reborde areolar.

2.2.1. Estructura microscópica

El área de desembocadura los conductos galatóforos está revestida de epitelio espinocelular estratificado, mientras que el revestimiento interno tiene una transición gradual hasta convertirse en dos capas de epitelio cúbico en el seno galactóforo, el cual se transforman después en una sola capa de epitelio cilíndrico o cúbico en el resto del sistema ductal.

Dentro del epitelio, entre las células epiteliales superficiales y la lámina basal se encuentra una capa de células mioepiteliales dispuestas en una malla que recuerda al tejido de una canasta, estas células están presentes en toda la sección secretora de la glándula pero son más evidentes en los conductos más grandes; miofibrillas y son muy similares a las del músculo liso.⁵⁶

Las células epiteliales típicamente se hallan adheridas a una capa subyacente denominada *membrana basal*, cuya capa interna se denomina *lámina basal*. La integridad de esta capa de sostén es importante en la evaluación de las muestras de biopsia de tejido mamario, ya que los cambios en esta membrana tienen implicaciones significativas en la vigilancia inmunitaria, la transformación, diferenciación y metástasis cancerígena.^{57, 58}

Durante el ciclo menstrual la mama inactiva experimenta cambios cíclicos leves. Al comienzo del ciclo los conductillos aparecen como cordones con una luz pequeña. Cuando es estimulado por estrógenos cerca de la ovulación, la altura de las células secretoras aumenta, la luz de los conductillos se hace evidente a medida que se acumulan las secreciones y se acumulan líquidos y lípidos en el tejido conectivo. Finalmente, en ausencia de una estimulación hormonal continua, la glándula regresa a un estado más inactivo durante el resto del ciclo.

2.2.2. Desarrollo de la mama

En el neonato, indistintamente de si es masculino o femenino, la glándula mamaria comienza su formación a partir de la quinta semana de gestación, con una invaginación del ectodermo hacia el mesodermo de la región axilar, iniciándose el desarrollo de los conductos mamarios hasta la conformación de los principales conductos galatóforos, y los cuales quedaran en un estado de reposo hasta la pubertad.

Durante la pubertad, al entrar en funcionamiento el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el desarrollo de la glándula mamaria sigue su curso y se promueve el crecimiento de ductos, alvéolos y estroma, que proliferan en forma notoria bajo el estímulo de los estrógenos y de la progesterona, para dar origen a un sistema ductolobular ramificado rodeado de estroma y tejido adiposo. Pero es hasta el embarazo cuando se termina su desarrollo al ocurrir una serie de cambios estructurales que permiten que se inicie con la secreción láctea.⁵⁹

En el embarazo, al prepararse para la lactancia, las glándulas mamarias exhiben una proliferación y desarrollo notables que se acompañan de reducciones relativas en la cantidad de tejido conectivo y adiposo. A medida que la mama se desarrolla produce un infiltrado de plasmocitos, linfocitos y eosinófilos del componente fibroso de tejido conectivo. Conforme las células proliferan por mitosis, los conductillos se ramifican y se desarrollan los alvéolos, y entre más avanza el embarazo. más se desarrollan los alvéolos. Hacia el final del estado de gravidez la proliferación de las células disminuye y el tamaño de las mamas aumenta mediante la hipertrofia de las células alveolares y la acumulación del producto de su secreción en la luz de los conductillos.

2.3. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Inicialmente, la clasificación del cáncer se basó en la apariencia morfológica del tumor, lo cual tiene series limitaciones, ya que tumores con apariencias histopatológicas similares pueden seguir cursos clínicos sumamente distintos.

La investigación sistemática de los patrones de expresión de cientos de genes en tumores usando microarreglos, y su correlación con características específicas de la variación fenotípica sentaron las bases para mejorar la taxonomía del cáncer,^{62, 144} complementando así la información que aporta la clasificación mediante los marcadores clínico-patológicos.⁶³

Los análisis de expresión global mediante mRNA ha permitido establecer cinco subtipos moleculares: Luminal (con los subtipos A y B), Basal, HER2 y Triple Negativo.⁶⁰ Dichos grupos moleculares muestran diferencias significativas en cuanto a su incidencia, probabilidad de supervivencia y respuesta a terapias.⁶³ La caracterización sistemática de los subtipos moleculares del cáncer de mama y varios genes marcadores útiles para el pronóstico, predicción y dianas terapéuticas.⁶

Pese a que, los carcinomas triple negativo y Basal-Like, se engloban en el mismo grupo

no deben considerarse sinónimos ya que únicamente del 49 al 71 % de los casos de cáncer de mama Triple Negativo son Basal-Like, y el 77 % de los Basal-Like son Triple Negativos.⁶⁴ El estándar de oro para el diagnóstico de carcinomas basal-like es el perfil de expresión génica por IHQ de RE-, HER2-, EGFR y CK5/6 +, los cuales tienen sensibilidad y especificidad variables.⁶⁵

2.4. Genes marcadores de origen celular.

2.4.1. Marcadores de origen para CaMa de tipo Basal

Citoqueratina 17 (KRT17).

Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, locus 21.2 (17q21.2) y codifica para un polipéptido de 432 aminoácidos con un peso molecular de 48,000 Daltons, tiene una longitud de 5 Kb e incluye 8 exones.



Figura 2.3: Estructura del Gen de CK17. Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de CK17.

Normalmente se expresa en las células basales del complejo epitelial, pero no en los epitelios simples no estratificados. Lo cual la convierte en un marcador que diferencia las células de origen basal del complejo epitelial, por tanto, es un indicador de la presencia de un tipo particular de célula troncal epitelial.⁶⁶

Función normal. La citoqueratina 17 es una proteína intermediaria filamentosa expresada en el epitelio estratificado, además de su utilidad en el soporte estructural del citoesqueleto, regula el crecimiento celular mediante su unión con la proteína adaptadora 14-3-3- σ , hay dos aminoácidos localizados en la porción amino-terminal de la KRT17 que son necesarios para el transporte sero-dependiente de 14-3-3- σ desde el núcleo hacia el citoplasma, y para la estimulación de la actividad de mTOR.⁶⁷

Integrina β 4 (ITG β 4).

El gen ITG β 4 se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, locus 25.1 (17q25.1), codifica para la proteína Integrina β -4, la cual cuenta con una región transmembranal

que divide a la molécula en un dominio extracelular (el extremo amino-terminal) y un dominio citoplasmático (el extremo carboxilo-terminal). El dominio extracelular exhibe un plegamiento cuádruple rico en cisteína que tiene un 35 % de relación con el de otras integrinas- β . El dominio citoplasmático es mucho más grande que el de otras integrinas con subunidades β y no tiene una relación significativa con ellas, pero su extensión sugiere que la ITG β 4 puede interactuar con otras proteínas citoplasmáticas.^{68, 69}

La longitud total en DNA del gen ITG β 4 es de 36498 pb⁸² y tiene 13 posibles transcritos (experimentalmente splicing alternativo), de los cuales 3 se traducen a isoformas funcionales “sanas” de la proteína.⁸¹

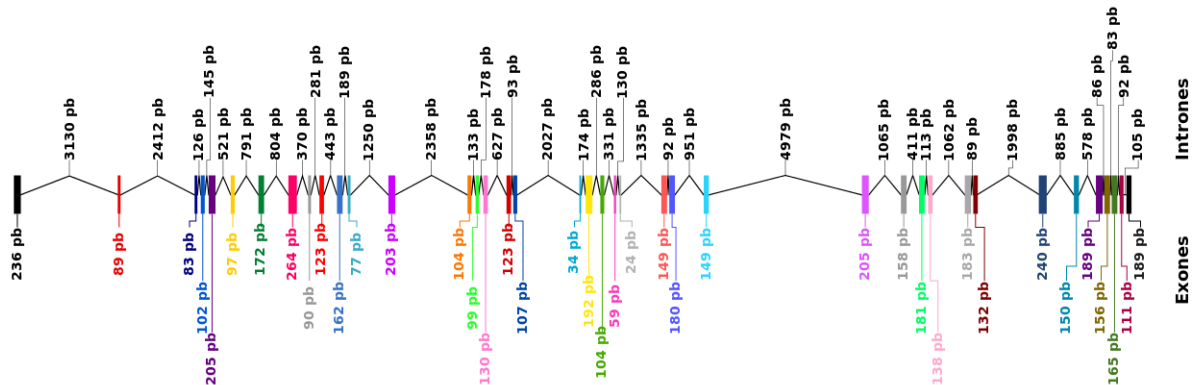


Figura 2.4: Estructura del Gen ITGB4. Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de ITG β 4.

Función normal. Las integrinas son receptores glicoprotéicos transmembranales que median la adhesión célula-matriz o célula-célula y participan en la transducción de señales que regulan la expresión génica y el crecimiento celular. Estas moléculas consisten en subunidades α y β unidas por enlaces no covalentes. Diferentes combinaciones de polipéptidos α y β forman complejos que varían su especificidad de unión a ligandos. Tanto las subunidades α como las β presentan: un dominio citoplasmático que interactúa con el citoesqueleto, una región transmembranal y un extenso dominio extracelular, que interactúa con la matriz extracelular. En particular, la integrina β -4 interactúa con la integrina α -6 para regular la adhesión de la célula a la matriz.⁷⁰

Sitios de expresión. Las integrinas forman dímeros α/β ; en los queratinocitos de las capas basales del epitelio humano se suelen expresar los complejos de integrinas: α -2/ β -1, α -3/ β -1 y α -6/ β -4. Mientras que los primeros dos se localizan principalmente en la superficie lateral de los queratinocitos y median la adhesión célula-célula, el complejo α -6/ β -4 se encuentra en la zona ventral de la célula, lo que explica su rol en la adhesión

célula-matriz.⁷⁰ La isoforma β -4D se expresa en colon y placenta, mientras que la isoforma β -4E se expresa en epidermis, pulmón, duodeno, corazón, bazo y estómago.⁸³

Relación con el cáncer de mama. El complejo α -6/ β -4 parece jugar un papel importante en la biología de los carcinomas invasivos. Se ha demostrado que, en la línea celular MDA-MB-35 de cáncer de mama humano, el complejo receptor α -6/ β -4 promueve la invasividad a través de la activación de la fosfoinositol-3-OH-cinasa (PI3K).

La estimulación del receptor α -6/ β -4 estimula mucho más la actividad de PI3K que los receptores con integrinas β -1. La regulación de PI3K mediante el complejo α -6/ β -4 se requiere para la formación de los sitios dinámicos de motilidad presentes en las células cancerígenas⁷¹

Laminina beta-1 (LAM β 1).

El gen LAM β 1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, locus 31.1.⁸⁰ Tiene una extensión de 80kb y está compuesto de 34 exones; puede generar hasta 13 transcritos por splicing alternativo, de los cuales solo 1 codifica para la proteína funcional.⁸¹

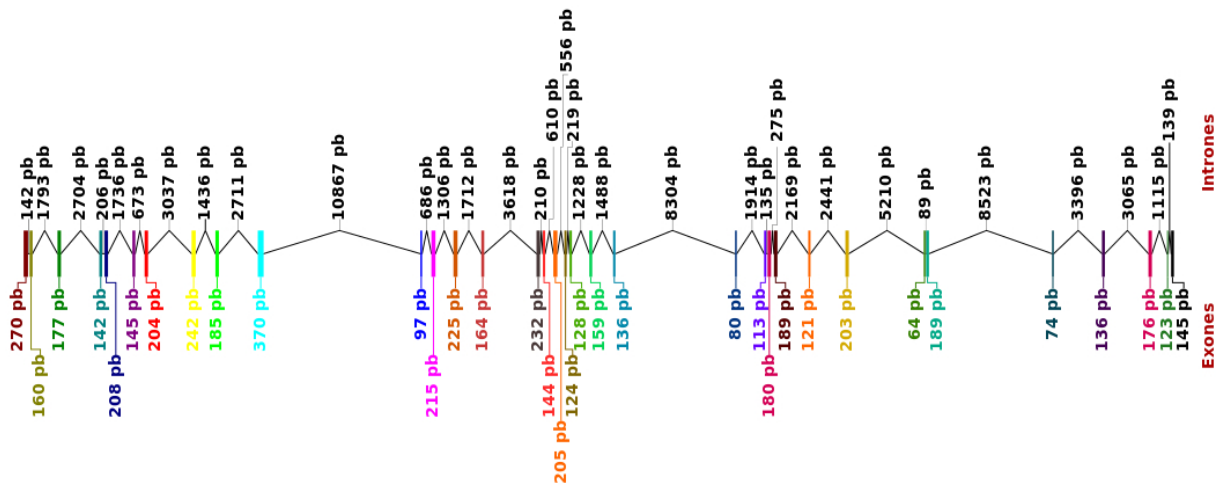


Figura 2.5: Estructura del Gen LAM β 1. Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de LAM β 1

La molécula de laminina pesa aproximadamente 1 millón de Daltons, y está compuesta por una cadena α y tres cadenas β unidas entre sí por enlaces disulfuro. Hasta la fecha se han descrito tres especies distintas de cadenas β . Cada laminina varía en función de su composición de cadenas β y se denomina como α -1, β -1 y γ -1.⁷³

Función normal. Los componentes principales de la membrana basal del epitelio son las glicoproteínas y el colágeno IV, siendo ambas moléculas heterodiméricas. Las lamininas son proteínas cruciformes compuesta de cadenas, fueron aisladas por primera vez a partir de la matriz extracelular de células tumorales.⁷² Las isoformas de las lamininas varían de una membrana basal a otra dependiendo del tipo de epitelio donde se encuentren. En particular, la cadena β -1 se involucra en la quimiotaxis y en la unión con el receptor de laminina en la membrana basal.⁷⁴

Relación con el cáncer de mama. En 1987, se descubrió que la laminina β -1 y su forma de amida tienen cierta capacidad para inhibir la metástasis. Específicamente, un derivado pentapéptido de la proteína original demostró reducir la formación de colonias tumorales en ratones con xenotransplantes de melanoma, además de que evidenció que inhibe la capacidad de invasión de las células tumorales en estudios *in vitro*.⁷⁵

v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (C-KIT).

El gen C-KIT se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4, locus 12. En su forma inmadura tiene una extensión de más de 70 kb de ADN e incluye 21 exones. El transcrito más largo es de 5,230 pares de bases y presenta splicing alternativo.⁷⁶

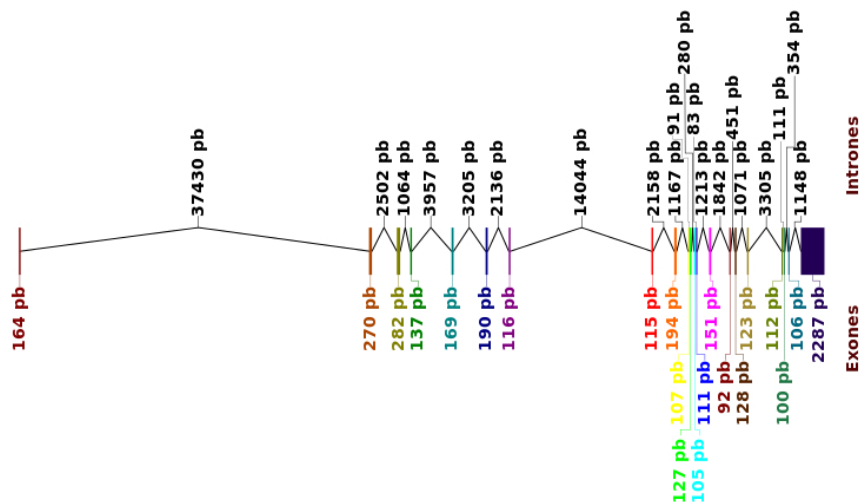


Figura 2.6: Estructura del Gen C-KIT. Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de C-KIT

C-KIT expresa una proteína transmembranal glicosilada que funciona como un receptor con actividad cinasa de tirosina (KIT) de 145 KD compuesta por un dominio extracelular, una región transmembranal y un dominio cinasa de tirosina. Cuando es estimulado, el receptor membranal mKIT libera una forma soluble de KIT (sKIT).⁷⁷

Función normal. La señalización dependiente del receptor C-KIT es esencial para el control del crecimiento, supervivencia y proliferación de las células germinales primordiales para la gametogénesis y la hematopoyesis. Además, regula la movilidad, adhesión y forma de la célula a través de cambios en el citoesqueleto.⁷⁸

Integrina- $\alpha 6$ (ITG $\alpha 6$).

El gen ITG $\alpha 6$ se localiza en el brazo largo del cromosoma 2, locus 31.1 (2q31.1), tiene una extensión de 79,100 pb, está compuesto por 26 exones y produce hasta 14 transcritos por splicing alternativo.⁸¹

La proteína resultante de la traducción del transcrito representativo tiene 1130 aminoácidos y pesa 126,606 Daltons; se trata de una integrina de cadena α compuesta por una cadena pesada y una ligera unidas entre sí por un puente disulfuro

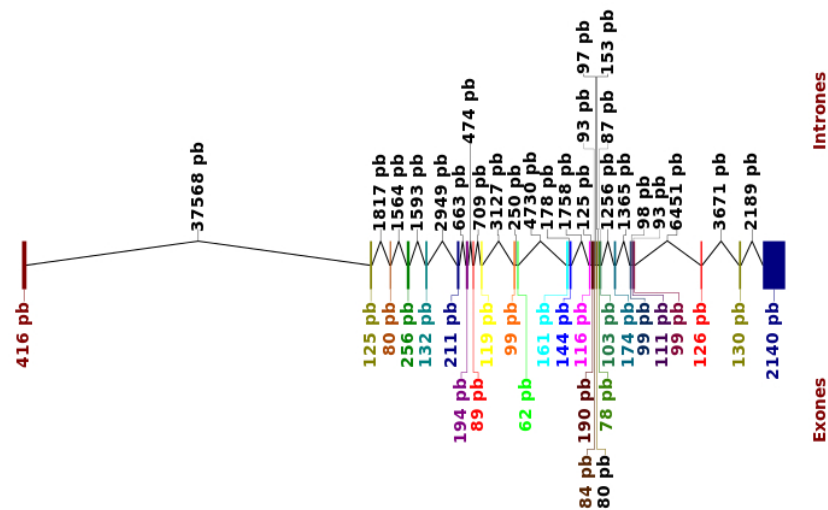


Figura 2.7: Estructura del Gen ITG $\alpha 6$ Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de ITG $\alpha 6$

Función normal. La integrina $\alpha 6$ se asocia con la integrina $\beta 4$ para generar un receptor de superficie celular que se expresa en las plaquetas y células epiteliales para su interacción con las lamininas en el control de la adhesión celular.⁸⁴

Metalotioneina 1X (MT1X).

El gen MT1X se localiza en el brazo largo del cromosoma 16, locus 13 (16q13).⁷⁹ Tiene una longitud de 1,773 bases y puede generar un máximo de 4 transcritos distintos por splicing alternativo.⁸¹

Codifica para una proteína de 61 aminoácidos, con un peso de 6068 Daltons, esta proteína contiene 2 dominios quelantes: el sitio A del dominio α , compuesto por 11 cisteínas que tiene capacidad para 4 iones divalentes; y el sitio B, que corresponde a una región dentro del dominio β , compuesto por 9 cisteínas y capaz de unirse a tres iones divalentes.⁸⁴

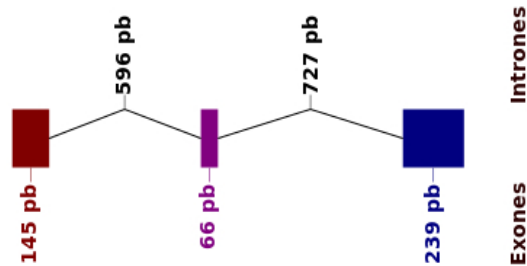


Figura 2.8: Estructura del Gen MT1X Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de MT1X

Función normal. Las metalotioneínas tienen un alto contenido de residuos de cisteína, lo cual les permite quelar varios metales pesados; la expresión de estas proteínas está regulada de manera directa por la concentración de metales pesados y los glucocorticoides⁸⁴

Proteína de unión a ácidos grasos 7 (FABP7).

FABP7 es un gen codificante de proteína, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 16, locus 22.31.⁸⁰ El gen tiene una longitud de 4,600 pb,⁸⁴ presenta 4 exones y se pueden obtener 2 transcritos distintos por acción de splicing alternativo.⁸¹

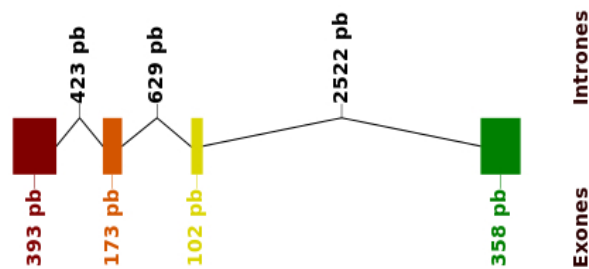


Figura 2.9: Estructura del Gen FABP7 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de FABP7

Codifica para una proteína de 132 aminoácidos y 14,889 Daltons. La familia de las proteínas de unión a ácidos grasos está compuesta por proteínas citoplasmáticas pequeñas altamente conservadas, que se unen a ácidos grasos de cadena larga y otros

ligandos hidrofóbicos para favorecer su transferencia intracelular; además, tiene un efecto estimulante sobre las enzimas que se involucran en los procesos metabólicos de los mismos ácidos grasos.⁸⁵

Función normal. FABP7 se involucra en el transporte de distintos ligandos hidrofóbicos con potencial actividad morfogénica durante el desarrollo del SNC, es necesaria para la migración de las neuronas inmaduras a sus correspondientes capas corticales.⁸⁶

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

EGFR es un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 7, locus 12 (7p12),⁸⁷ tiene una longitud de 237,600 pares de bases; contiene 28 exones⁸⁸ y puede dar lugar hasta un máximo de 11 transcritos mediante splicing alternativo.^{81, 84}

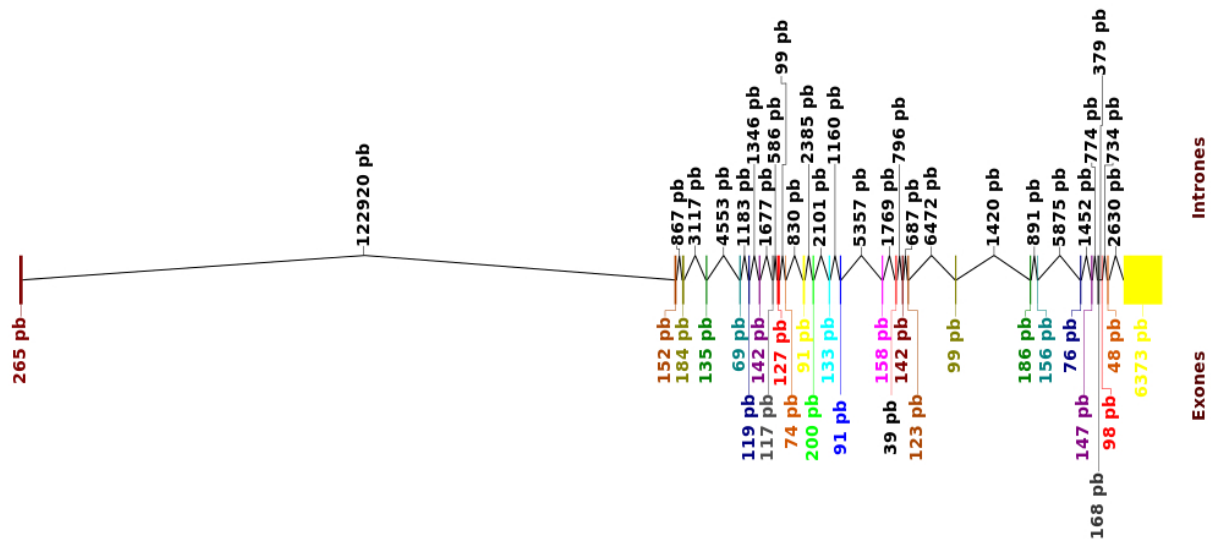


Figura 2.10: Estructura del Gen EGFR Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de EGFR

La proteína codificada por este gen es una glicoproteína transmembranal miembro de la superfamilia de las cinasas; es un receptor para factores de crecimiento celular epitelial.⁸⁴ La molécula EGFR cuenta con 3 regiones: una proyección extracelular que contiene el sitio de unión al factor de crecimiento epitelial (EGF); una región transmembranal y una región citoplasmática. EGFR es una cinasa que fosforila los residuos de tirosina de las proteínas de señalización a las que regula.⁸⁹

Función normal. El receptor EGFR interviene en varias cascadas de señalización, entre ellas, modular las pequeñas GTPasas de la familia Rho y Rab interconectando ambas vías

de señalización mediante EPS8 que es un sustrato de EGFR el cual se acopla con SOS1 por acción de E3B1, mediando de ese modo la activación de RAC. A través de su dominio SH3, EPS8 interactúa con RNTRE, que es una proteína activadora de GTPasa cuya actividad se regula por EGFR. Si RNTRE se acopla con EPS8, juntas, actúan sobre RAB5 e impide la internalización de EGFR. Además RNTRE inhibe la acción activante de EPS8 sobre RAC, lo que resulta en la atenuación de la vía de RAC. Por lo que su función en la vía de RAC o RAB depende de si su interacción se da con E3B1 ó RNTRE.⁹⁰

Otra de sus funciones, al ser activado mediante HBEGF al ocurrir una lesión en la piel, es propiciar la secreción de los polipéptidos antimicrobianos β -defensina-103, lipocalina-2 y SLPI, lo que incrementa la resistencia a una infección o a la colonización microbiana del sitio de lesión.⁹¹

Cadherina 3, tipo 1 (CDH3).

El gen CDH3 se localiza en el brazo largo del cromosoma 16, locus 22.1 (16q22.1);⁹² tiene una longitud de 86,428 pares de bases. Cuenta con 16 exones y puede generar hasta 10 transcritos mediante splicing alternativo.⁸¹

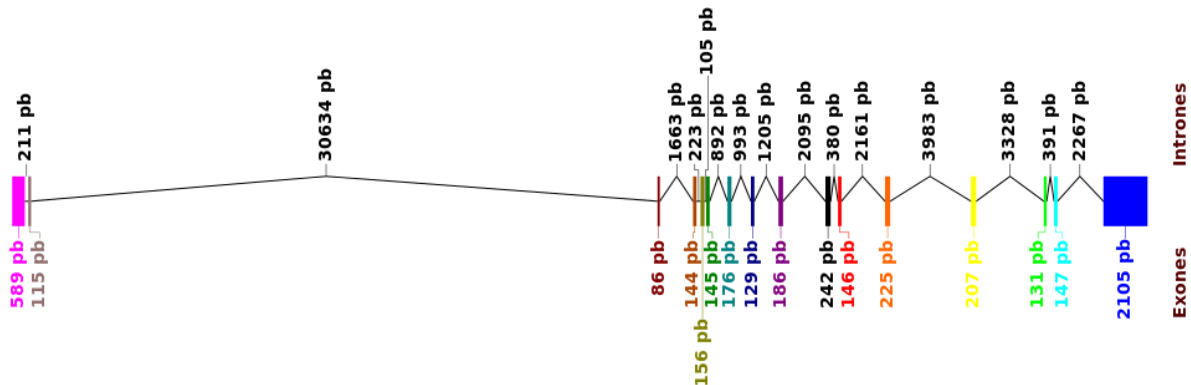


Figura 2.11: Estructura del Gen CDH3 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de CDH3

Codifica para una proteína de 829 aminoácidos con un peso de 991,418 Daltons, cinco cadherinas extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplasmática altamente conservada.

Función normal. Las cadherinas son glicoproteínas membranales calcio-dependientes responsables de la adhesión celular. CDH3 Se expresa en el borde celular e interviene en las uniones estrechas o tight-union (célula-célula).⁹³ En estudios de inmunohistoquímica se han encontrado altos niveles de Cadherina 3 en la leche humana provenientes de las

células epiteliales del tejido lactóforo. A través de estudios de Western blot revelaron que la cadherina contenida en la leche humana es una isoforma soluble que cuenta el dominio extracelular pero no el intracelular.⁹⁴

Relación con el cáncer de mama. La sobreexpresión de cadherina 3 se ha asociado con lesiones proliferativas de alto grado histológico, polaridad celular baja y corta esperanza de vida de pacientes con cáncer de mama. Se ha propuesto que la actividad reducida del receptor alfa estrógeno (ESRA) es la causa de una sobreexpresión aberrante de cadherina 3, promoviendo la migración celular y la invasividad del cáncer de mama. Por otro lado CEBPB regula positivamente la expresión de CDH3 en las células de cáncer de mama, así pues, la expresión de CDH3 está asociada con un mal pronóstico para la paciente con cáncer de mama.⁹⁵

Factor Nuclear $\kappa\beta$, sub-unidad 1 (NF $\kappa\beta$ 1).

El gen NF $\kappa\beta$ 1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 4, locus 24 (4q24).⁹⁶ Cuenta con 24 exones y tiene una longitud total de 115,974 pares de bases,^{84, 97} puede generar hasta 12 transcritos por splicing alternativo.⁸¹

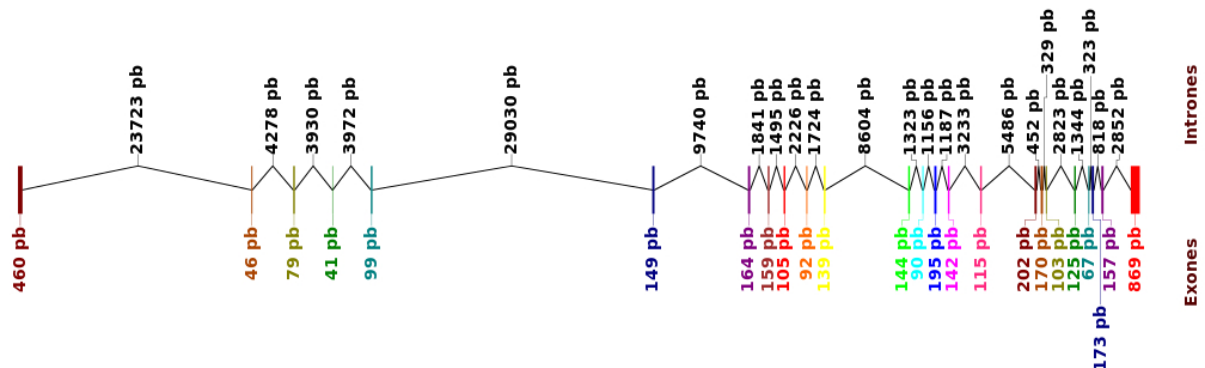


Figura 2.12: Estructura del Gen NF $\kappa\beta$ 1 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de NF $\kappa\beta$ 1

El gen codifica para una proteína de 968 aminoácidos y un peso de 105,000 Daltons. NF $\kappa\beta$ es un regulador transcripcional que se activa por estímulos tanto intra como extracelulares.⁸⁴

Función normal. NF $\kappa\beta$ 1 es un factor de transcripción pleiotrópico presente en casi todos los tipos celulares y es el eslabón final de varias vías de señalización participantes en multitud de procesos biológicos tales como inmunidad, inflamación, crecimiento celular, diferenciación celular, tumorigenesis y apoptosis.^{99, 100}

Relación con el cáncer de mama. En estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama con afinidad metastásica a hueso; se encontró que la actividad de $\text{NF}\kappa\beta$ en las células cancerígenas promueve la reabsorción del hueso, característica de la metástasis osteolítica. Infiriendo que un blanco de $\text{NF}\kappa\beta$ es CSF2, que medía la metástasis osteolítica de cáncer de mama estimulando la activación de los osteoclastos.¹⁰²

2.4.2. Marcadores de origen para CaMa de tipo Luminal.

Receptor de estrógeno tipo 1 (ESR1).

El gen ESR1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 26, locus 25.1 (26q25.1). Se trata de un gen codificante con una longitud de 472,929 pares de bases con 8 exones y, que mediante splicing alternativo genera hasta 13 transcritos, estos suelen diferir únicamente en sus regiones 5' no traducidas y los polipéptidos resultantes presentan poca variabilidad entre sí.^{103, 104}



Figura 2.13: Estructura del Gen ESR1 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de ESR1, incluyendo su tamaño (pb)

La proteína resultante de la traducción del mensajero tiene una longitud de 595 aminoácidos y un peso de 66,216 Daltons. Como su nombre lo indica, funciona como un receptor a estrógeno, es un factor de transcripción que se activa por la unión con su ligando. Contiene 3 dominios: uno para la unión al ligando (estrógenos), un sitio de unión a DNA y un sitio de activación de la transcripción.⁸⁴

Función normal. Mediante estudios de inmunocitoquímica se ha analizado la localización de ESR- α y ESR- β en diversos tejidos humanos, observándose en ovario, útero, vagina (solo ESR- α), testículos, conductos eferentes (solo ESR- β), células de Sertoli, células de Leydig, próstata y epididimo. En la mama, se han observado ambos tipos de receptores, tanto en las células epiteliales como en las estromales¹⁰⁷

En 1988 se logró demostrar que el gen se expresa en las levaduras, usando un constructo que contenía el cDNA del receptor humano ESR1 y un promotor PGK de levadura. La iniciación de la transcripción en dicho sistema se opera de manera estrictamente hormono-dependiente y se documentó un alto nivel de conservación de este mecanismo de activación.¹⁰⁵

Se ha planteado que la progresión del cáncer de mama dependiente de estrógenos a su forma independiente, esté mediada por la expresión de formas mutantes y/o variantes de ESR1. Existen 2 isoformas funcionales del gen ESR: ESR1 (ESR- α) y ESR2 (ESR- β), cada una se presenta en distintos tejidos y tiene su propio patrón de expresión celular y se sospecha que juegan un papel importante en el desarrollo del tumor mediando su respuesta a estrógenos, lo que conlleva a una mayor o menor eficacia de las terapias hormonales sobre los carcinomas.¹⁰⁶

Relación con el cáncer de mama. La presencia de ESR1 categoriza a los pacientes en el grupo de bajo riesgo de recidivas y con mejor esperanza de supervivencia.¹¹² La cuantificación de ESR se ha convertido en una prueba estándar para el monitoreo clínico del cáncer de mama. La expresión de este receptor provee una panorámica de aquellos tumores que tienen probabilidades de responder a una terapia hormonal; sin embargo, solo la mitad de los pacientes ESR (+) tienen una respuesta favorable al tratamiento con hormonas, e inclusive aquellos que inicialmente tuvieron una respuesta positiva pueden desarrollar una modalidad de cáncer resistente a la terapia endocrina

Mediante ensayos de transfección, se ha demostrado que BRCA1 suprime la dependencia de estrógenos del epitelio mamario que se encuentran en proliferación, esto mediante la inhibición de las vías de control transcripcional mediadas por ESR, y la pérdida de esta propiedad contribuye al aumento de la proliferación tumoral.¹⁰⁸

EL extremo carboxilo-terminal de MUC1 se asocia con ESR1 uniéndose directamente con su dominio transcripcional y estabiliza a ESR1 impediendo de su ubiquitinización y degradación, estimulando de esta forma la transcripción mediada por ESR1 y contribuyendo al crecimiento y supervivencia de las células de cáncer de mama.¹⁰⁹

Forkhead Box A1 (FOXA1) / Factor nuclear de hepatocitos 3- α (HNF3A)

El gen FOXA1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 14, locus 21.1 (14q21.1).¹¹¹ Tiene una longitud total de 10,057 pares de bases y está compuesto por 2 exones, mediante splicing alternativo puede generar hasta 5 transcritos, de los cuales solo 2 son codificantes.^{81, 84}

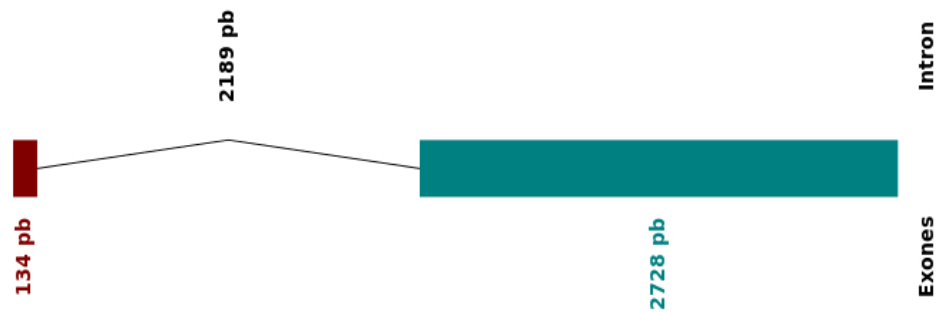


Figura 2.14: Estructura del Gen FOXA1 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de FOXA1, incluyendo su tamaño (pb)

Codifica para una proteína de la familia de los factores nucleares de los hepatocitos, inicialmente se creía que eran exclusivos del hígado, por lo que se les denominó como activadores transcripcionales para transcritos específicos del hígado (HNF) de donde recibe su nombre. La familia HNF3 incluye a HNF3 α (FOXA1), HNF3 β y HNF3 γ los cuales también son miembros del grupo de proteínas de unión a DNA con cabeza de tenedor (Forkhead).

La proteína FOXA1 tiene una cadena de 472 aminoácidos y pesa 49148 Daltons, se expresa en tejidos que tienen origen embrionario endodérmico como son: estómago, intestinos, hígado y pulmón.¹¹³

Función normal. FOXA1 es un factor de transcripción involucrado en: el desarrollo embrionario, el establecimiento de la expresión genética específica de cada tejido y en la regulación de la expresión génica de los tejidos diferenciados. Se ha sugerido que actúa como un factor “pionero” abriendo la cromatina compacta a otras proteínas mediante interacciones con las histonas presentes en el nucleosoma, modificando la unión de las histonas a los sitios promotores y sitios de potenciadores de la transcripción (enhancers). Su acción sobre la cromatina depende de la distribución de la histona H3 metilada en “Lys-5” (H3K4me2). Por estas razones, se propone que juega un papel importante en la traducción de las firmas epigenéticas a programas transcripcionales tejido específico que son comandados por enhancers específicos.⁸³

Modula la actividad transcripcional de los receptores nucleares de hormonas. Originalmente fue descrito como un activador de la transcripción de genes hepáticos como: AFP, Albúmina, ATT y PEPCK, entre otros.⁸⁴

Relación con el cáncer de mama. Se ha detectado una alta expresión de FOXA1 en tumores de cáncer de mama ESR(+). Se involucra en la transcripción de los genes

mediada por ESR1; es requerido para la unión de ESR al promotor de NKX2-1 en las células de cáncer de mama; se une al promotor de RPRM y se requiere para la represión inducida por estrógenos de RPRM. Casi todas las interacciones de ESR con la cromatina y los cambios de expresión genética en las células cancerígenas dependen de FOXA1. Curiosamente FOXA1 también se requiere para que ocurra la actividad inhibitoria del tamoxifen contra tumores ESR(+).¹¹⁴

FOXA1 inhibe la expresión de BCL2 y de esta forma controla el proceso de apoptosis. Interviene en la regulación del ciclo celular activando la expresión de CDKN1B lo que conlleva al arresto celular en las fases G0/G1, lo cual puede hacerlo por sí mismo, o en conjunto con BRCA1.⁸⁴

Proteína de unión GATA-3 (GATA3).

El gen GATA3 se localiza en el locus 14 del brazo largo del cromosoma 10.⁸⁰ Tiene una longitud de 21,598 pares de bases, cuenta con 6 exones y es sometido a splicing alternativo, proceso que genera hasta 4 variantes de transcritos, de los cuales solo 2 codifican para la proteína.⁸¹

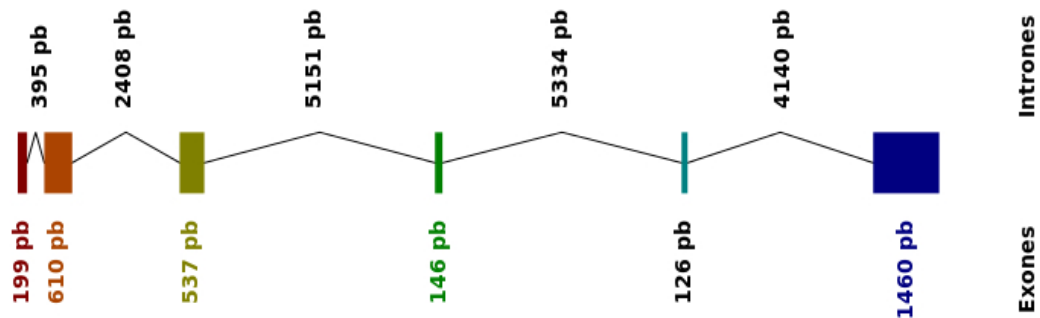


Figura 2.15: Estructura del Gen GATA3 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de GATA3, incluyendo su tamaño (pb)

El gen traduce para una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción GATA, la variante 3 posee una cadena de 443 aminoácidos y pesa 47,916 Daltons.⁸³ Contiene dos dedos de zinc que le permiten ser un regulador del desarrollo de las células T, además tiene un papel importante en la biología de las células endoteliales.¹¹⁵

Función normal Las células T CD4 potencian el proceso inflamatorio de la respuesta inmune mediante la acción de las células Th1 y Th2; GATA3 es expresado en altas concentraciones en las células de la estirpe Th2 vírgenes y recién activadas, donde es necesaria para la expresión de los genes de citocinas. GATA3 se une al promotor del gen

IL5 y es crítico para su expresión, de tal forma que regula el balance del reclutamiento de las células Th1 y Th2.¹¹⁷

GATA2 y GATA3 se expresan en los precursores de los adipocitos blancos, y su expresión es necesaria para la maduración de dichas células. Su efecto en la maduración celular está mediado por la inhibición directa del PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ). Las células madre embrionarias deficientes de GATA3 presentan una alta tendencia a diferenciarse en adipocitos: por otra parte, una expresión defectuosa de GATA2 y GATA3 se asocia con predisposición a obesidad.¹¹⁸

En estudios hechos en ratones, se encontró que GATA3 es el factor de transcripción con mayor expresión en el epitelio mamario durante la pubertad. La delección dirigida de GATA3 provoca graves defectos en el desarrollo mamario, debido a un fallo en la etapa final de la formación de los lobullos durante la pubertad. En ratones adultos sometidos a knock-in de GATA3 las células luminales presentan alteración en su diferenciación que conllevan a desprendimiento de la membrana basal y apoptosis.¹¹⁹

Relación con el cáncer de mama. Se involucra en el desarrollo epitelial mamario y en la progresión del cáncer de mama, actualmente se categoriza como un marcador inmunohistoquímico. Está asociado con la señalización de los receptores de estrógeno (ER), y aunque se ha reportado expresión de GATA3 en cáncer de tipo ER(-) su función en estos tipos de cáncer aun no está completamente dilucidada.¹²⁰

Citoqueratina 8 (KRT8).

El gen KRT8 se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, locus 13.13 (12q13.13),¹²¹ tiene una longitud total de 52,768 pares de bases⁸⁴ y cuenta con 9 exones, es sometido a splicing alternativo lo que genera 18 transcritos, de los cuales solamente 3 son funcionales.⁸¹

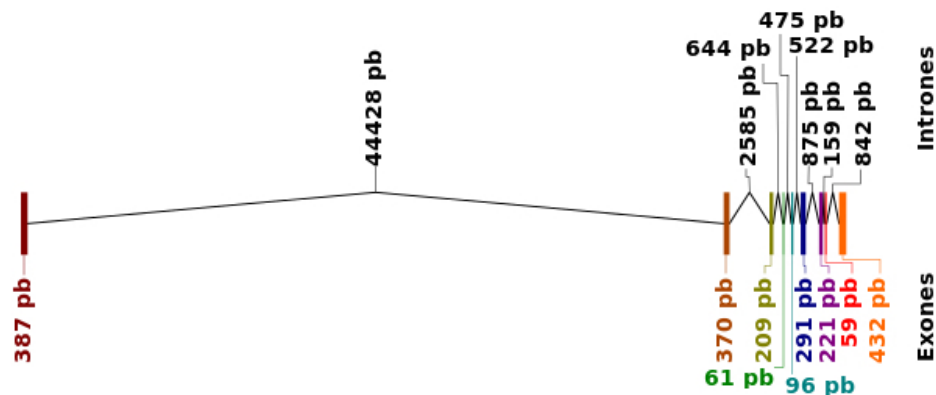


Figura 2.16: Estructura del Gen KRT8 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de KRT8, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

El gen codifica para una proteína de 438 aminoácidos y 53,704 Daltons, se teoriza que existen 2 isoformas, pero hasta la fecha no hay una confirmación experimental de su existencia.⁸⁴

Función normal. La citoqueratina 8 se expresa en conjunto con la citoqueratina 18 para formar los filamentos intermedios en las células epiteliales de capa simple. Esta proteína mantiene la integridad estructural de la célula y también interviene en la transducción de señales que conllevan a la diferenciación celular.⁸⁴

Citoqueratina 18 (KRT18).

El gen KRT18 se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, locus 13.¹²¹ Tiene una extensión total de 4,031 pares de bases y cuenta con 7 intrones. Mediante el proceso de splicing alternativo puede generar hasta 7 transcritos.⁸¹

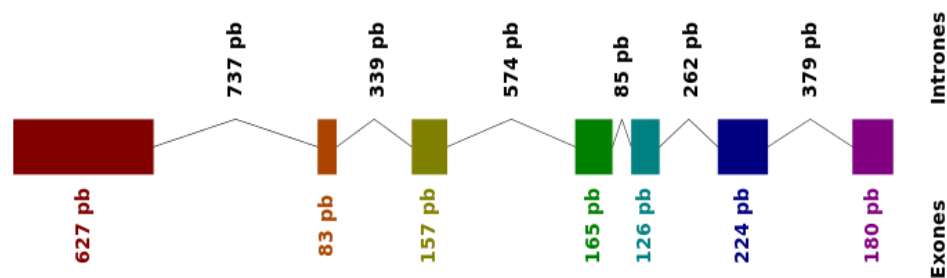


Figura 2.17: Estructura del Gen KRT18 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de KRT18, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

KRT18 codifica para una proteína de 430 aminoácidos y 48,058 Daltons. La citoqueratina 18 es una citoqueratina de tipo I filamentosa que se expresa conjuntamente con KRT8 en las células de los tejidos epiteliales de capa sencilla, ambas, KRT8 y KRT18 son las primeras proteínas filamentosas que aparecen durante el desarrollo murino. Las queratinas de tipo I y II usualmente se expresan en proporciones iguales.¹²²

Función normal. Está involucrada en la expresión de los complejos de trombina-antitrombina en las células hepáticas, en su forma fosforilada se encarga de la reorganización de los filamentos del citoesqueleto.⁸³

Factor 3 de Trebol [Trefoil Factor 3] (TFF3).

El gen TFF3 se localiza en el brazo largo del cromosoma 21, locus 22.3 (21q22.3),¹²⁶ tiene una extensión total de 3,985 pares de bases y posee 3 exones. Mediante splicing

alternativo puede formar 4 transcritos.⁸¹

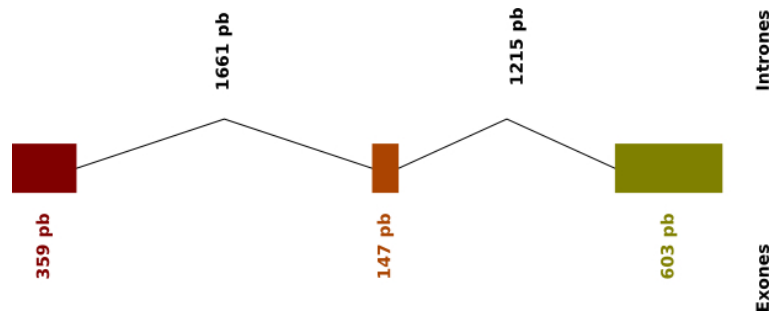


Figura 2.18: Estructura del Gen TFF3 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de TFF3, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

TFF3 codifica para una proteína de 80 aminoácidos cuyo peso molecular es de 8,641 Daltons, ésta proteína pertenece a la familia Trefoil, que se caracteriza por poseer al menos una copia del patron trefoil, un dominio de 40 aminoácidos que contiene tres disulfuros conservados que unen cada uno un par de cisteínas, formando una estructura característica de “trebol”. Son proteínas secretadas por la mucosa intestinal.^{84, 127}

Función normal. Los péptidos de la familia TFF interactúan con las mucinas e influyen en la viscosidad de las mucosas. Promueven la migración de las células epiteliales y está ligado al proceso de inhibición de la apoptosis, inducen la dispersión celular y disparan la quimiotaxis en la respuesta inmune.¹²⁷

X-box binding protein 1 (XBP1).

El gen XBP1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 22, locus 12.1 (22q12.1),¹²⁸ tiene una extensión total de 6,043 pares de bases y posee 5 exones. Experimenta splicing alternativo, lo que le permite generar hasta 7 transcritos distintos.⁸¹ Este gen codifica para una proteína de 261 aminoácidos y 28,695 Daltons.⁸³

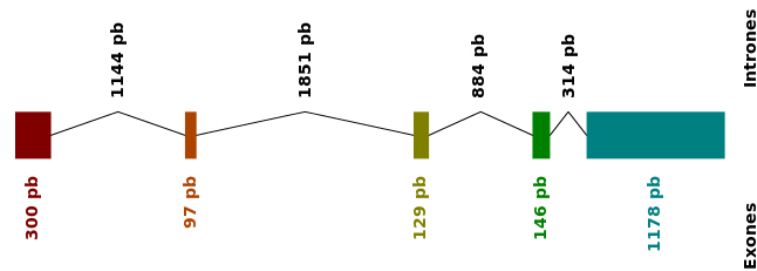


Figura 2.19: Estructura del Gen XBP1 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de XBP1, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

Función normal. XBP1 es un factor transcripcional que regula el reconocimiento del promotor X2 del complejo mayor de histocompatibilidad por las células B.¹²⁸ Controla la expresión de IL4, IL6, e interviene en la producción de IgM, regulando así el crecimiento y supervivencia de las células plasmáticas.¹³⁰ En el hígado, XBP1 es un regulador clave requerido para la síntesis normal de ácidos grasos.¹³¹

Relación con el cáncer de mama. Se ha reportado que XBP1 se activa en algunos casos de cáncer de mama y tiene un papel fundamental en su tumorigénesis y progresión de esta patología. En las líneas celulares de cáncer de mama, su ausencia inhibe el crecimiento tumoral y disminuye la probabilidad de recidivas, además reduce la población de células CD44(+)/CD24(-). También se ha reportado la expresión de este gen en algunos casos de cáncer de mama Triple Negativo, en los que potencia la expresión de HIF1A, el cual suele estar hiperactivado en este tipo de cáncer de mama, lo que ha sido relacionado con un mal pronóstico para la paciente.¹²⁹

2.4.3. Marcadores de origen para CaMa tipo HER2(+).

Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2 (V-ERB-B2), Tyrosine Kinase Type Cell Surface Receptor (HER2) o Neuroblastoma /glioblastoma Derived Oncogen Homolog (NEU).

HER2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, en el locus 12 (17q12).¹³² Tiene una extensión de 42,513 pares de bases⁸⁴ y cuenta con 26 intrones. Experimenta splicing alternativo, a través del cual puede generar hasta 22 transcritos.⁸¹

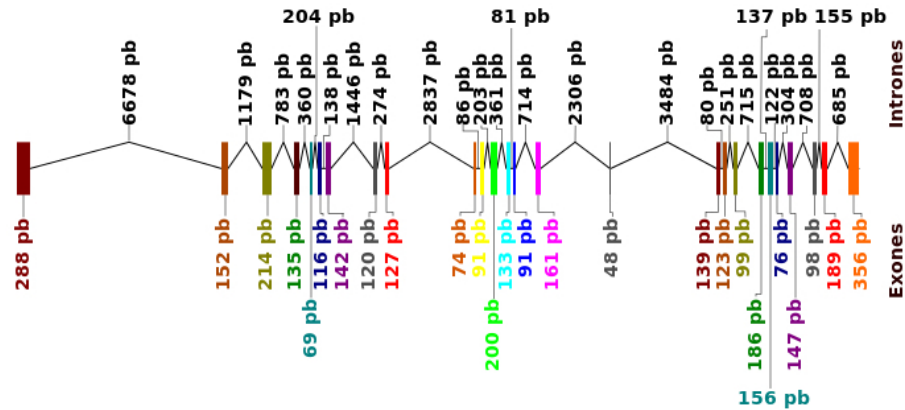


Figura 2.20: Estructura del Gen HER2 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de HER2, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

El mRNA funcional traduce para una proteína de 1255 aminoácidos y 137,910 Daltons,⁸³ que es un receptor con actividad cinasa de tirocina miembro de la familia ErbB (a la que también pertenece EGFR), hasta la fecha se han identificado 4 miembros de esta familia. Su vía de señalización se inicia por la unión del ligando al dominio de unión extracelular del receptor (en este caso HER2), lo cual inicia la homo/heterodimerización y autofosforilación del dominio intracelular (actividad cinasa de tirosina), estos cambios resultan en la activación del receptor, lo cual resulta en la activación y fosforilación de los sustratos citoplasmáticos y el inicio de la cascada de señalización que puede controlar varias respuestas celulares incluyendo cambios en la expresión genética, rearreglos de citoesqueleto, anti-apoptosis e incremento de la proliferación celular.

Función normal. Forma parte del complejo de receptores de superficie celular pero, aparentemente requiere de un co-receptor para su unión con el ligando. Es un componente esencial del complejo receptor de neuregulina, sin embargo, las neuregulinas no interactúan con HER2 por sí solo. GP3 es un ligando potencial para este receptor.

Regula el crecimiento y la estabilización de los microtúbulos periféricos (Mts). Posterior a la activación de HER2, la vía de señalización de MEMO1-RHOA-DIAPH1 promueve la inhibición de GSK3B en la membrana celular, lo cual evita la fosforilación de APC y CLASP2, permitiendo la asociación de los mismos con la membrana celular. Así, la unión a membrana de APC permite la localización de MACF1 en la membrana celular, lo que se requiere para la captura y estabilización de los microtúbulos en la membrana. Se involucra en la regulación del crecimiento celular.⁸³

Relación con el cáncer de mama. En 1987, se demostró que basta con la sobreexpresión del gen HER2 para convertirlo de un receptor para factores de crecimiento

normal a un oncogen, sin que se requiera un cambio directo sobre la proteína expresada.¹³³ También se ha observado que la sobreexpresión de HER2 propicia el crecimiento de los carcinomas ductales de mama.¹³⁴

Por otro lado, hay evidencia que indica que HER2 puede estar involucrado en la determinación de la quimiosensibilidad del cáncer de mama y de ovario.^{135, 136} Su sobreexpresión le confiere al cáncer de mama resistencia al efecto apoptótico del Taxol. Normalmente el taxol activa a la cinasa CDC2, lo que provoca que la célula quede arrestada en la fase G2/M del ciclo celular, lo que conlleva a la apoptosis. La sobre-expresión de HER2 provoca el aumento de la expresión de CDKN1A, que se asocia con CDC2, lo que impide que se pueda llevar a cabo el arresto celular y por tanto, la apoptosis no se activa.¹³⁷

Growth Factor Receptor-Bound Proteín 7, Epidermal growth factor receptor (GRB7).

GRB7 es un gen codificante localizado en el locus 12 del brazo largo del cromosoma 17 (12q17), tiene una longitud de 9,383 pares de bases,⁸⁴ y está compuesto por 15 exones, mediante *splicing* alternativo puede dar lugar hasta a 14 variante de transcritos.⁸¹

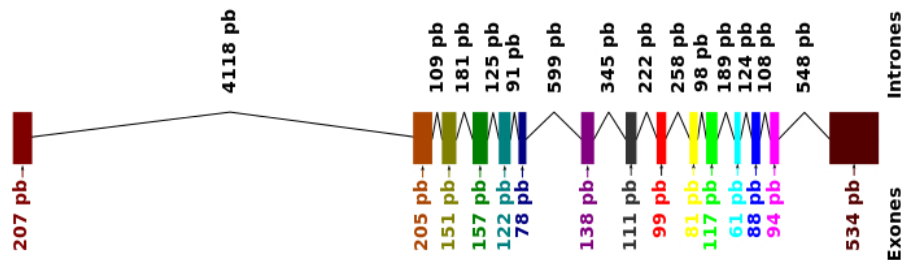


Figura 2.21: Estructura del Gen GRB7 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de GRB7, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

Codifica para una proteína de 532 aminoácidos de extensión y 59,681 Daltons de peso molecular. El producto de este gen pertenece a una pequeña familia de proteínas adaptadoras que interactúan con una variedad de receptores con actividad cinasa de tirosina y otras moléculas de señalización.¹¹⁵

Función normal. Interactúa con el dominio citoplasmático de numerosos receptores de cinasas y modula su señalización río abajo. Promueve la activación de cinasas downstream, incluyendo STAT3, AKT1, MAPK1, y/o MAPK3. Promueve la activación de HRAS. Juega un papel importante en la transducción de señal en respuesta a EGF. Interviene en la regulación de la proliferación y migración celular, cuando no está fosforilado se une al extremo 5'UTR de algunos mRNA y reprime su traducción.⁸³ En estudios de silenciamiento

de GBR7 a través de siRNAs se demostró que la expresión de GRB7 en las líneas celulares de cáncer de mama HER2 (+), disminuye la activación de RAS, la proliferación celular, la formación de colonias en 2D y 3D y la activación mediada por la integrina RAC1 y la migración de células integrina-dirigidas, con estos estudios se diseccionó la cascada de señalización mediada por HER2 que conllevan a demostrar que el acople de GRB7 con HER2 es necesario para inducir las señales de proliferación y migración de las células tumorales HER2 (+).¹³⁸

2.4.4. Marcadores de origen para CaMa tipo Triple Negativo (Basal-like TN).

Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (BIRC5).

Se trata de un gen codificante para proteína localizado en el locus 25 del brazo largo del cromosoma 17 (17q25).¹⁴⁰ Tiene una longitud de 11,451 pares de bases y posee 4 exones, experimenta el proceso de splicing alternativo, lo cual da lugar hasta 11 transcritos distintos.⁸¹

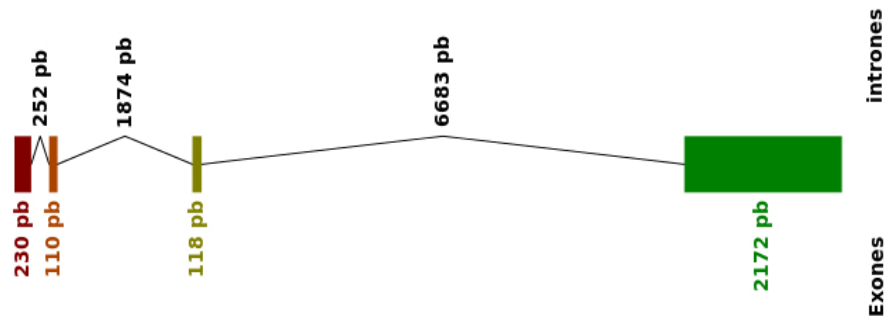


Figura 2.22: Estructura del Gen BIRC5 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de BIRC5, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

El gen codifica para una proteína de 142 aminoácidos y 16,389 Daltons de peso. Esta proteína es miembro de la familia de inhibidores de apoptosis (IAP) que, como su nombre lo indica, previenen la muerte celular por apoptosis. Los miembros de la familia IAP usualmente contienen múltiples dominios de repeticiones de baculovirus IAP (BIR), sin embargo, la proteína de este gen en particular contiene un solo dominio BIR.⁸³

Función normal. Las proteínas de la familia IAP intervienen en la muerte y división celular, así como en la tumorigénesis. BIRC5 se expresa en la fase G2/M del ciclo celular de manera regulada. Al principio de la mitosis, BIRC5 se asocia con los microtúbulos de los husos mitóticos en una reacción específica y saturable que se regula por la dinámica de los

mismos. La disrupción de las interacciones BIRC5-microtubulos provoca una pérdida de la función apoptótica de BIRC5 y un incremento en la actividad de CASP3, un mecanismo involucrado en la muerte celular durante la mitosis.¹⁴¹

Citoqueratina 5 (KRT5).

KRT5 es un gen codificante de proteínas localizado en el brazo largo del cromosoma 12, locus 13.13; cuenta con un longitud de 6,113 pares de bases⁸⁴ y está compuesto por 9 exones. Sufre splicing alternativo, proceso mediante el cual genera un máximo de 11 transcritos, de los cuales 5 no codifican, 5 codifican para proteínas defectuosas y solo 1 codifica para su proteína funcional.⁸¹

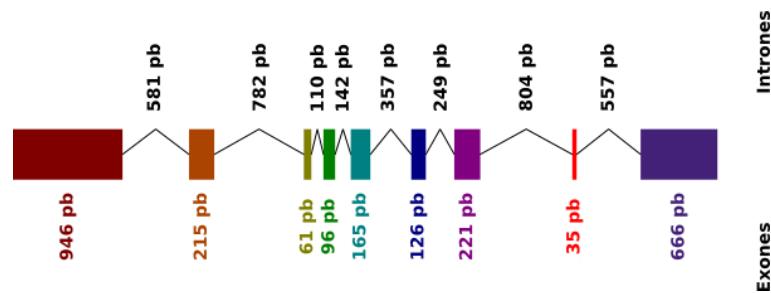


Figura 2.23: Estructura del Gen KRT5 Representación esquemática de los intrones y exones que conforman el gen de KRT5, se incluye el tamaño en (pb) de cada uno

La proteína KRT5 posee una cadena de 590 aminoácidos y un peso de 62378 Daltons. Suele formar heterodímeros con otras citoqueratinas, principalmente KRT14.⁸³

Función normal. Se expresa en la capa basal de la epidermis en conjunto con KRT14 para formar filamentos intermedios constitutivos del citoesqueleto celular.⁸³

Planteamiento del problema

En México, el cáncer de mama es la principal causa de muerte de mujeres por neoplasia.⁷ A diferencia de los países de primer mundo, en los cuales la incidencia de cáncer de mama es relativamente alta, pero la mortandad es baja. En México las tasas de mortandad se mantiene en un estado de continuo crecimiento,⁸ esto debido, entre otros motivos, a la falta de un programa de detección oportuna del mismo, ya que la carencia de equipos de mastografía, la sobresaturación de los sistemas de salud, y el poco impacto que han tenido las campañas de autoexploración en la población, dificultan el diagnóstico en las etapas tempranas de la enfermedad, momento en el cual el tratamiento es mucho mas simple y efectivo.

Aunado a lo anterior, no es solo importante la detección de la presencia del cáncer, además, la caracterización del mismo es de sumo interés para el equipo médico, ya que mediante la categorización del tipo de tumor también es posible hacer un pronóstico acerca de la progresión de la enfermedad y determinar la mejor opción para el tratamiento del mismo^{63, 144} En la actualidad, los métodos de diferenciación de los tumores mamarios se llevan a cabo, primeramente desde el punto de vista anatómico-patológico en la clínica y durante cirugía, y, en segunda instancia a través de las características moleculares mediante estudios de laboratorio bajo técnicas de marcaje inmunohistoquímico, las cuales son tardadas, caras y gran parte de su efectividad recaen en la habilidad del personal técnico para interpretarlas, además de que requieren de una muestra del propio tumor.

De ahí que, se requieran de nuevos métodos para detección oportuna y categorización fiable del cáncer de mama, que además, puedan ser aplicados de manera generalizada a la población sin que su costo supere las posibilidades de financiación de los sistemas de salud, tal como el metodo de detección de Células TumORAles Circulantes mediante la identificación de expresión genética que proponemos en este trabajo.

Hipótesis

Partiendo de que:

1. El cáncer de mama es una patología caracterizada por la proliferación descontrolada de las células pertenecientes al área mamaria.
2. Dicha proliferación descontrolada se acompaña por una desdiferenciación de las mismas
3. La causa de esas modificaciones en la función celular se debe a cambios en la expresión de genes específicos
4. Se ha observado que es posible categorizar al cáncer de mama en subtipos moleculares en función de los marcadores que son expresados por las células tumorales.
5. Durante la historia natural del cáncer de mama se liberan células tumorales a la circulación sanguínea.

Se postula que:

Las células tumorales circulantes de cáncer de mama conservan un patrón transcripcional tejido específico que permite la identificación del tipo de cáncer de mama, aunque este se encuentre en etapa subclínica, por lo que consideramos que al determinar el patrón transcripcional expresado por las CTCs presentes en éstas pacientes se puede determinar el origen celular del tumor.

Capítulo 5

Objetivos

5.1. General

Determinar en muestras sanguíneas de pacientes clínicamente sanas, la presencia de células tumorales circulantes de cáncer de mama y su perfil transcripcional mediante la detección de genes marcadores de células cancerígenas en muestras de sangre de mujeres clínicamente sanas, para el desarrollo y validación de un método de diagnóstico temprano de cáncer de mama.

5.2. Específicos

1. Determinar la frecuencia de muestras que sean positivas a Mammaglobina A.
2. Determinar la frecuencia de muestras que sean positivas a HER 2.
3. Determinar el perfil transcripcional de las muestras positivas para CK-17, Mammaglobina A y HER 2.
4. Determinar el origen celular de las CTCs, a través de su perfil transcripcional.

Capítulo 6

Metodología

6.1. Tipo de estudio

Observacional prospectivo transversal descriptivo

6.2. Población de estudio

Muestras de sangre pertenecientes a mujeres adultas clínicamente sanas, catalogadas como aptas para donación que acudan a donar sangre en la unidad de banco de sangre del Hospital Regional “1º de Octubre” durante el periodo del abril de 2013 a septiembre de 2014.

6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

6.3.1. Inclusión

Participaron todas las mujeres que cumplieron los requisitos establecidos por la Norma Oficial Mexicana *NOM-253-SSA1-2012 “Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”*, inciso 6 “Selección de donantes para uso terapéutico alogénico” y verificados por el personal del banco de sangre, y que además, firmaron la carta de consentimiento informado que autorice el uso de sus muestras en el estudio.

6.3.2. Exclusión

Las donadoras no deben tener antecedentes de tratamiento contra ningún tipo de cáncer ni ser rechazadas por el servicio de banco de sangre.

6.3.3. Eliminación

Las muestras de las candidatas que por estudios de serología, o hematología fueron declaradas como “no aptas” para la donación por el servicio de banco de sangre serán automáticamente eliminadas, así como aquellas que expresamente pidan su salida del proyecto, sin que esto demerite la atención médica a su familiar o a ella misma.

6.4. Metodología experimental

6.4.1. Fase Pre-experimental

Determinación del tamaño de la muestra

Se tomó como base primaria la presencia de los genes CK17, MamA y HER2, y a partir de sus frecuencias de expresión se realizó una estimación hipotética a un 6.5 % de muestras positivas en el grupo de mujeres clínicamente sanas frente a un 98 % de positivos en los grupos control.

En relación con los datos reportados en la literatura para las pacientes con cáncer de mama diagnosticadas bajo las directrices de la NOM-041. La muestra se calculó usando la incidencia del cáncer de mama en la población mexicana, con un nivel de confianza de 95 % y un a variación del 2.6 %, tomando en cuenta un error α de 0.5 %, y, estimando la población femenina de México en 50,000,000 se calculó que la muestra debería integrarse por 1420 mujeres, para facilitar los cálculos de recursos se optó por completar un bloque de 1500 mujeres clínicamente sanas.

Obtención del consentimiento informado y la muestra sanguínea

Se informó, mediante exposición hablada a las posibles donadoras acerca de los objetivos del proyecto, la utilidad de su participación y cuáles serían los beneficios a largo plazo y los posibles riesgos, haciendo hincapié en que la participación es opcional y no repercutiría en la calidad de la atención que el hospital le brinde a ella o a su(s) familiares.

Se solicitó a la donadora su participación mediante la donación del concentrado leucocitario, mismo que se obtiene por el fraccionamiento de sangre total posterior a la donación altruista de sangre. A las Donadoras que aceptaron participar en el proyecto se les solicitó que firmaran la Carta de Consentimiento Informado, la cual les fue otorgada de manera individual para su lectura (o, de preferirlo la donadora, le fue leída en voz alta) y se les aclararon todas las dudas que expresaran. A cada muestra se le asignó un número control consecutivo como medida de protección de la privacidad de las donantes

La extracción de sangre total se llevó a cabo siguiendo los estándares observados por la *NOM-253-SSA1-202*, la muestra recolectada para el estudio consistió en el concentrado leucocitario, residuo de la separación de las fases sanguíneas útiles para la transfusión.

Las bolsas con el concentrado leucitario fueron transportadas al laboratorio de Medicina Genómica en condiciones de refrigeración (4°C), donde se rotularon con el correspondiente número control y se continuó con los procedimientos experimentales.

6.4.2. Fase Experimental

Separación de células nucleadas (Ficoll-Paque)

Las bolsas contenedoras del concentrado leucocitario fueron sanitizadas empleando etanol al 70% y una gasa estéril. En un tubo falcon de 50mL se colocaron 12.5mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare®) y se le añadieron 12.5mL de concentrado leucocitario teniendo cuidado de no romper la tensión superficial del Ficoll, la muestra así preparada se centrifugó a 3500rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, desactivando el frenado automático y permitiendo a la centrifuga desacelerar por sí misma para evitar romper el gradiente. Al finalizar el proceso de centrifugado se obtuvieron 4 fases: el paquete eritrocitario, una interfaz de Ficoll®, la fase leucocitaria y el plasma de la muestra.

Con ayuda de una pipeta Beral se transfirió la fase leucocitaria a tubos eppendorf de 1.5mL (tantos como fuera necesario).

La fase leucocitaria obtenida fue centrifugada a 14,000rpm durante 10 minutos a TA, se decantó el sobrenadante y se añadieron 500µL de TriZol LS (ambion®) a cada tubo para posteriormente homogeneizar la mezcla usando un vortex, en este punto se puede proceder a la extracción del material genético o se puede almacenar la muestra en ultra-congelación (-80°C).

Extracción de RNA total mediante TriZol®

Trabajando siempre en hielo y con los reactivos fríos (almacenados a -20°C) se procedió a realizar el aislamiento del RNA total de las células obtenidas en el paso anterior usando el método de Trizol-Cloroformo para obtener de 20 a 50µL de solución acuosa de RNA: Las muestras adicionadas con TriZol® fueron resuspendidas y sometidas a una incubación durante 5min a TA; a continuación se agregaron 200µL de Cloroformo a cada tubo y se homogeneizó con agitación vigorosa manual durante 15 segundos, esto para favorecer la compactación de las proteínas, se incubaron durante 5min a TA y, en seguida, se centrifugaron a 12,500rpm durante 15min a 4°C.

Al terminar la centrifugación anterior, se generaron tres fases en los tubos contenedores:

- Una fase orgánica (inferior, color rosado) que contiene los restos celulares
- Una Interfaz blanca, contenedora de DNA
- Una Fase acuosa sobrenadante (translúcida) donde se encuentra disuelto el RNA

Se procedió a recuperar las fases acuosas de cada muestra depositándola en tubos Eppendorf nuevos (se recolectó la mayor cantidad de fase acuosa por cada muestra en la menor cantidad de tubos), en seguida se adicionaron $500\mu\text{L}$ de isopropanol homogeneizando suavemente por inversión e incubando durante 10min a TA, promoviendo de esta manera la precipitación del RNA.

Las muestras fueron centrifugadas a 12,500rpm durante 10min a 4°C . Al termino de la cual se eliminó el sobrenadante.

La pastilla resultante del paso anterior se lavó con 1mL de etanol al 75 %, en caso de tener mas de una pastilla en diferentes tubos para la misma muestra, estas se recolectaron en un solo contenedor usando primero $500\mu\text{L}$ de etanol para arrastrar las pastillas y después otros $500\mu\text{L}$ para arrastrar los posibles remanentes que pudieran quedar en las paredes de los tubos excedentes (de cualquier manera, el volumen de etanol en el contenedor final fue 1mL).

Después del lavado las pastillas fueron centrifugadas a 8000rpm durante 5min a 4°C .

Finalmente, el etanol se decantó y los tubos se colocaron en posicion invertida sobre un papel absorbente para eliminar los restos de etanol. Las pastillas de RNA seco se resuspendieron en agua grado biología molecular ajustando su volumen en función del tamaño del botón obtenido.

La muestra de RNA disuelta se almacenó a -80°C hasta su uso para retrotranscripción o para su cuantificación y verificación de integridad.

Cuantificación de RNA obtenido (Espectrofotometría)

A partir del RNA obtenido por el procedimiento anterior, se prepararon $10\mu\text{L}$ de una dilución 1:10 usando agua grado biología molecular como diluyente.

Se empleó el equipo de espectrofotometría “NanoDrop1000” o “NanoDrop8000” (Thermo-Sientific®) para cuantificar la concentración de ácidos nucleicos (RNA) presentes en $1\mu\text{L}$ de la dilución 1:10 de RNA total. El equipo muestra, en su pantalla principal una serie de datos:

- El tipo de muestra que se esta cuantificando
- Identificador de muestra
- Gráfica del espectro de absorbancia de la muestra
- Absorbancia a 260nm
- Absorbancia a 280nm
- Relación de absorbancia 260/280

- Relación de absorbancia 260/230¹
- Concentración de RNA en la muestra (en ng/ μ L)

Multiplicar el valor de concentración que calcule el equipo por 10 (factor de dilución).

Verificación de la integridad del RNA extraído (electroforesis en Gel de agarosa)

Se prepararon geles de agarosa al 1% con Buffer TAE 1x como disolvente. En el primer pozo del gel se colocaron 2 μ L de Marcador de peso molecular de 100pb.

A 7 μ L de la dilución 1:10 de RNA preparada anteriormente se le añadieron 2 μ L de Buffer de carga "Cyan Orange 3x", y se colocaron en el segundo pozo del gel (o subsecuentes según la cantidad de muestras a verificar, cada gel cuenta con 14 pozos)

El corrimiento electroforético se realizó induciendo una corriente de 80 volts durante 45 minutos, al termino de lo cual se reveló el gel usando un fotodocumentador con lámpara de luz UV y se le tomó una fotografía. Óptimamente se deberán ver 3 bandas, 1 correspondiente a DNA genómico libre (parte superior del gel), 1 correspondiente a la subunidad mayor del RNA ribosomal (~1900 pb) y 1 correspondiente a la subunidad menor del RNA ribosomal (1000 pb). Las bandas deben observarse claras, la presencia de barridos o la ausencia de bandas de RNA indican muestras degradadas.

Retrotranscripción (mRNA \rightarrow cDNA)

A partir del RNA extraído y verificado, se preparó un volumen de 10 μ L de dilución con concentración de 1 μ g/ μ L de RNA. Se emplearon 7 μ L de esta dilución como templado para el proceso de retrotranscripción.

Para eliminar el DNA contaminante al templado se la añadió 1 μ L de DNAsa (Invitrogen) y 1 μ L de buffer para DNAsa (Invitrogen), incubando durante 15min a TA, terminada la incubación se procedió a inactivar la DNAsa adicionando 1 μ L de EDTA e incubando a 65°C durante 15min seguidos de una incubación durante 1min en hielo.

Se adicionó 1 μ L de Oligo dT y se incubó a 70°C durante 10min, seguidos de una incubación en hielo durante 1min, acto seguido, se añadieron 7 μ L de mezcla de reacción (Ver anexo) y se incubó durante 5min a 42°C, adicionando después 1 μ L de retrotranscriptasa "SuperScript III" después se realizaron dos incubaciones, la primera a 55°C por 50 min, y el segundo periodo a 70°C durante 15 minutos.

Por ultimo, y para deshacer los emparejamientos de RNA-cDNA, se añadió 1 μ L de RNAsa H a cada reacción y se llevó a cabo una incubación a 37°C por 20min, posteriormene

¹La relación 260/280 de la muestra debe estar entre 1.8 y 2.1, de lo contrario la muestra deberá ser descartada y re-extraída ya que no será viable para la retrotranscripción debido a un exceso de contaminantes químicos.

el cDNA se mantuvo a 4°C y se diluyó en relación 1:5 para obtener un volumen final de 100µL de dilución de trabajo. El cDNA diluido se almacenó a -80°C hasta su uso.

Verificación de la Retrotranscripción (PCR de β -actina)

El procedimiento anterior permite obtener cDNA a partir de una muestra de RNA mensajero, para verificar su viabilidad se realizó una PCR en punto final para el gen de β -actina, para realizar esta prueba se emplearon, por cada muestra 2µL del cDNA previamente diluido al que se añadieron 22µL de mezcla de reacción (Ver anexo). Se utilizaron los primers universales para β -actina diseñados por el Dr. José Francisco Martínez Pérez y cuya secuencia es:

- Primer F: **AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT**
- Primer R: **TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA**

El protocolo de termociclado empleado fue el específico para β -actina (Ver anexo). Los amplicones se verificaron mediante su patrón de corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%, con las siguientes condiciones: 60V, 400mA durante 60min.

PCR en tiempo real (RT-PCR), Panel básico de detección de CTCs (Marcadores: CK-17, Mammaglobina A y HER2)

La detección de CTCs en las muestras de sangre se llevó a cabo mediante la búsqueda de los marcadores CK-17, Mammaglobina A, y HER2 usando la técnica de PCR en tiempo real. Se emplearon Sondas TaqMan marcadas con FAM, cada sonda usada fue diseñada específicamente para su respectivo gen.

Las reacciones se procesaron en placas MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), usando un pozo por placa. A cada pozo se le añadieron 2.5µL de cDNA muestra, 2.5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) y 0.25µL de la respectiva sonda TaqMan a una concentración de 10µM. Se empleó el termociclador en tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystems®), con las siguientes condiciones de termociclado:

- 1 periodo de activación (37°/10min)
- 1 Ciclo de desnaturalización inicial del cDNA (95°C/10min)
- 45 ciclos de amplificación:
 - 1 paso de desnaturalización del cDNA (95°C/30seg)
 - 1 paso de hibridación-extensión (60°C/1 min)

El equipo cuantificó la fluorescencia emitida por el fluoroforo FAM al final de cada periodo de extensión.

Protocolo para qPCR con Kit EXPRESS qPCR Supermix Universal (Invitrogen)

22/04/15

PLACA 11

Preparar la siguiente Mezcla de reacción (suficiente para el número de reacciones programadas +1 de cada sonda)

Reactivo	Rx GAPDH		Rx HER2		Rx KRT17		Rx Mam-A	
	1	100	1	100	1	100	1	100
qPCR MasterMix 2x	2.50	250.00	2.50	250.0	2.50	250.0	2.50	250.0
Fluorescent primer (Sonda)	0.25	25.00	0.25	25.00	0.25	25.00	0.25	25.00
Agua GBM cbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Vol. MIX (µL)	2.75	275.00	2.75	275.00	2.75	275.00	2.75	275.00
Vol. cDNA	2.50	250.0	2.5	250.0	2.50	250.00	2.50	250.00
Vol. Final	5.25	525.00	5.25	525.00	5.25	525.00	5.25	525.00

Sondas a usar:

Gen	Assay	Fluoroforo
GAPDH	Hs99999903_m1	FAM
HER2	Hs00170433_m1	FAM
KRT17	Hs01588578_m1	FAM
MAM-A	Hs00935948_m1	FAM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
B	H2O H2O	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A	KRT17 SEC-A
C	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
D	1205 1205	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213	1213 1213
E	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
F	1206 1206	1214 1214	1222 1222	1230 1230	1238 1238	1246 1246	1254 1254	1262 1262	1270 1270	1278 1278	1286 1286	1294 1294	1302 1302	1310 1310	1318 1318	1326 1326	1334 1334	1342 1342	1350 1350	1358 1358	1366 1366	1374 1374	1382 1382	1390 1390
G	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
H	1207 1207	1215 1215	1223 1223	1231 1231	1239 1239	1247 1247	1255 1255	1263 1263	1271 1271	1279 1279	1287 1287	1295 1295	1303 1303	1311 1311	1319 1319	1327 1327	1335 1335	1343 1343	1351 1351	1359 1359	1367 1367	1375 1375	1383 1383	1391 1391
I	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
J	1208 1208	1216 1216	1224 1224	1232 1232	1240 1240	1248 1248	1256 1256	1264 1264	1272 1272	1280 1280	1288 1288	1296 1296	1304 1304	1312 1312	1320 1320	1328 1328	1336 1336	1344 1344	1352 1352	1360 1360	1368 1368	1376 1376	1384 1384	1392 1392
K	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
L	1209 1209	1217 1217	1225 1225	1233 1233	1241 1241	1249 1249	1257 1257	1265 1265	1273 1273	1281 1281	1289 1289	1297 1297	1305 1305	1313 1313	1321 1321	1329 1329	1337 1337	1345 1345	1353 1353	1361 1361	1369 1369	1377 1377	1385 1385	1393 1393
M	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
N	1210 1210	1218 1218	1226 1226	1234 1234	1242 1242	1250 1250	1258 1258	1266 1266	1274 1274	1282 1282	1290 1290	1298 1298	1306 1306	1314 1314	1322 1322	1330 1330	1338 1338	1346 1346	1354 1354	1362 1362	1370 1370	1378 1378	1386 1386	1394 1394
O	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2	GAPDH HER2
P	1211 1211	1219 1219	1227 1227	1235 1235	1243 1243	1251 1251	1259 1259	1267 1267	1275 1275	1283 1283	1291 1291	1299 1299	1307 1307	1315 1315	1323 1323	1331 1331	1339 1339	1347 1347	1355 1355	1363 1363	1371 1371	1379 1379	1387 1387	1395 1395

Programa de ciclado en equipo 7900HT:

Cubrir la placa con film óptico y dar un Push

Ciclos	Tiempo	t (°C)
1	10min	37
1	10min	95
45	10seg	95
	1min	60

Figura 6.1: Protocolo de Trabajo para la búsqueda de los marcadores del Panel básico (Detección de CTCs). Se utilizarán Sondas de hidrólisis TaqMan a una concentración 10µM.

PCR en tiempo real (RT-PCR), Panel ampliado de Origen tumoral

Aquellas muestras en las que, a través de la ejecución del panel anterior fue detectada la presencia de CTCs mediante la observación de las combinaciones de marcadores:

- HER2+/CK17+/MamA+
- HER2+/CK17+/MamA-
- HER2+/CK17-/MamA+
- HER2-/CK17+/MamA+
- HER2-/CK17-/MamA+

Se sometieron al escrutinio de origen tumoral mediante la aplicación del panel ampliado de marcadores de origen, que consta de los genes:

Se empleó la técnica de RT-PCR y se usaron sondas TaqMan marcadas con FAM específicas para cada uno de los genes, las reacciones se procesaron en placas MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), usando un pozo por placa. Las proporciones de los reactivos para la mezcla de reacción fueron los mismos que para el panel anterior. Se empleó el termociclador en tiempo real 7900 HT Fast (Applied Biosystems), con las mismas condiciones de termociclado usadas para el panel básico. Para asegurar la máxima calidad de los resultados de PCR se utilizaron los genes constitutivos: GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ACTB (Actin, beta), CXCL11 (Chemokine “C-X-C motif” ligand 11) y CXCL16 (Chemokine “C-X-C motif” ligand 16) como controles positivos de amplificación y agua grado biología molecular como control negativo en todos los casos.

Resultados

Se recolectaron 1502 muestras de sangre total donadas por mujeres clínicamente sanas en la unidad de Banco de sangre del Hospital Regional 1° de Octubre, de estas, un total de 413 muestras fueron dadas de baja debido a varios factores, siendo la degradación del RNA extraído la principal causa de pérdida; en un intento de recuperar la mayor cantidad de muestras posibles se realizaron re-extracciones de aquellas muestras con disponibilidad de sangre total.

Cuadro 7.1: Muestras estudiadas

Muestras	Perfil Transcripcional			ID CTCs	Totales	
	Sangre	Tumor	Adyacente		Perfil	General
Recibidas	43	43	43	1502	129	1631
Analizadas	43	43	43	1268	129	1397
Íntegras	18	22	15	855	55	910
Desechadas	25	21	28	413	74	487
Reextracciones	0	0	0	250	0	250
RT	27	21	23	1217	71	1288
β-Actina	27	21	23	1217	71	1288

RT: Retrotranscripciones

β -Actina: Verificaciones de RT

Aquellas muestras que mediante la verificación por electroforesis en gel mostraron RNA de buena calidad, y cuya concentración y volumen disponible fueron suficientes se sometieron al proceso de retrotranscripción para obtener cDNA, que se verificó mediante

una posterior PCR para detección del gen de β -actina, seguida de una electroforesis en gel de agarosa para revelar los amplicones. Las muestras que presentaron la banda de 218pb correspondiente al amplicon del gen β -actina se dispusieron para el estudio de PCR en tiempo real de búsqueda de los marcadores del perfil básico para detección de CTCs.

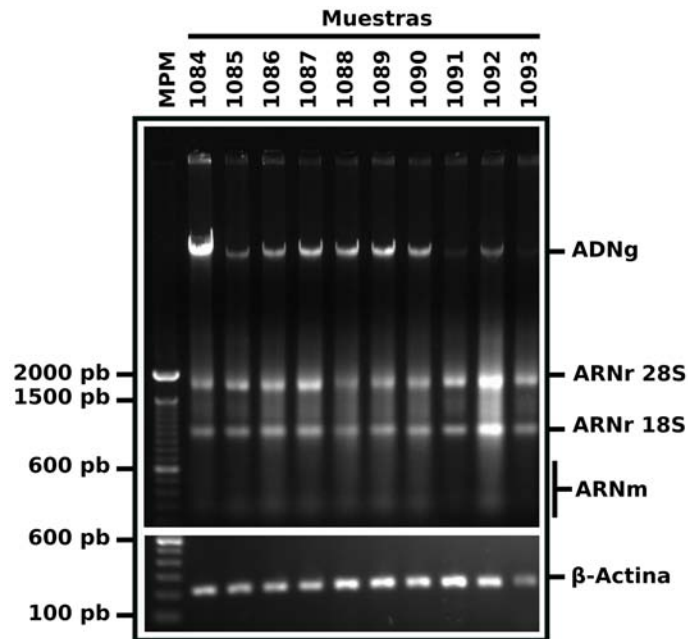


Figura 7.1: Patrón de corrimiento electroforético de ARN total y β -Actina: La fotografía muestra en el panel superior el patrón de corrimiento electroforético de ARN total que presentaron algunas muestras donadas por mujeres catalogadas como: “Clínicamente sanas y aptas para la donación”, y en el panel inferior muestras la amplificación de un segmento de 218 pares de bases del gen de β -Actina, que corrobora el éxito del procedimiento de retrotranscripción

Con las muestras positivas al amplicón de β -actina se procedió a estandarizar las sondas para el panel básico de detección de CTCs. usando $5\mu\text{L}$ de cDNA previamente diluido se determinó el CT de cada una de las sondas a estandarizar, respetando las condiciones de preparación de las reacciones y termociclado anteriormente descritas. Observándose que los genes problema mostraron CTs mayores a 25 ciclos. Se utilizó como control interno al gen constitutivo GA3PDH, cuya enzima producto es de vital importancia en el ciclo de Krebs, este gen presentó CTs superiores a 20 ciclos. (Figura 7.2)

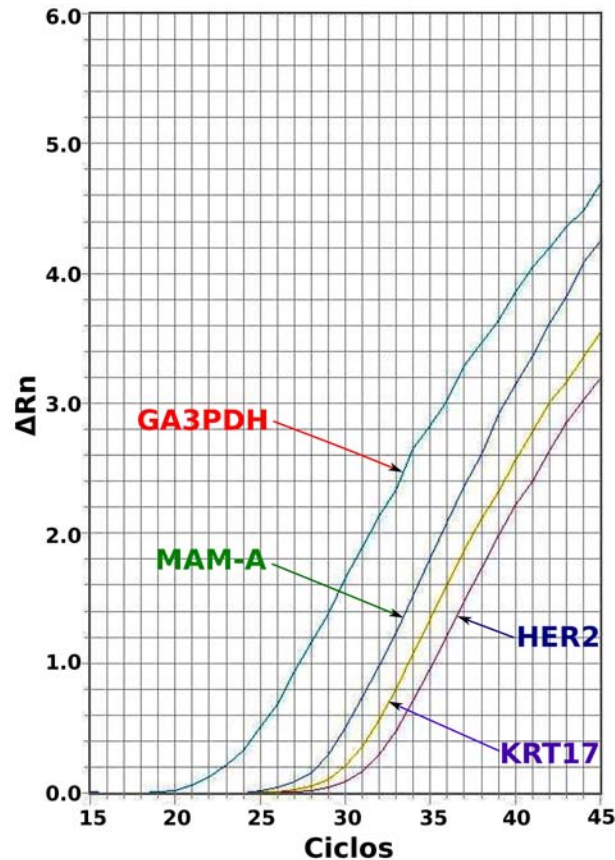


Figura 7.2: Panel de identificación: La identificación de las mujeres clínicamente sanas en las que se puede establecer un diagnóstico temprano de cáncer de mama, se realizó con la amplificación por PRC en tiempo real de los genes: **GA3PDH** = Glyceraldehide 3 phosphate dehydrogenase, **MAM-A** = Mammaglobin 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 la búsqueda de los genes del panel Básico (por la técnica de PCR en tiempo real) se lograron identificar 11 pacientes positivas a los genes de rastreo de CTCs (Cuadro 7.4), incluso entre este pequeño grupo de pacientes positivas se encontró variación en el fenotipo expresado.

El panel básico para detección de CTCs en pacientes clínicamente sanas se conforma de tres genes identificadores y un gen constitutivo. Solo se marcaron como positivas aquellas pacientes que presentaron al menos 2 marcadores de identificación, dándole mayor peso a la presencia de Mam-A y CK-17, ya que dichos genes son específicos de tejido epitelial (CK17) y del tejido secretor mamario (MAM-A), por lo cual no deberían estar presentes en la circulación; por otro lado HER2 cuenta con un nivel de alerta mas bajo y se considera como complementario debido a que los leucocitos normalmente expresan dicho receptor.

Cuadro 7.2: Fenotipos de las muestras positivas a cáncer de mama, los marcadores de CTCs en sangre periférica fueron identificados en experimentos realizados por triplicado.

<i>Fenotipo</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

Usando las muestras positivas al panel básico se procedió a hacer la estandarización de las sondas TaqMan para los marcadores del panel ampliado de origen molecular, Los genes se agruparon en función de los subtipos de Cáncer de mama para los cuales son selectivos, se usó como gen constitutivo a GA3PDH. Se observó que los genes problema presentaron CTs variantes entre los ciclos 22 y 34.

Los grupos de marcadores para el Panel ampliado (Origen tumoral) fueron los siguientes:

Cuadro 7.3: Grupos de genes utilizados como marcadores moleculares de origen tumoral

Subtipo Molecular		
Basal	Luminal	Basal-Like/TN
ITGB4	ESR1	BIRC1
LAMB1	FOXA1	EGFR
C-KIT	GATA3	KRT5
ITGA6	KRT8	NOTCH1
MT1X	KRT18	
FABP7	TFF3	
CDH3	XBP1	
EGFR		
NF κ B1		

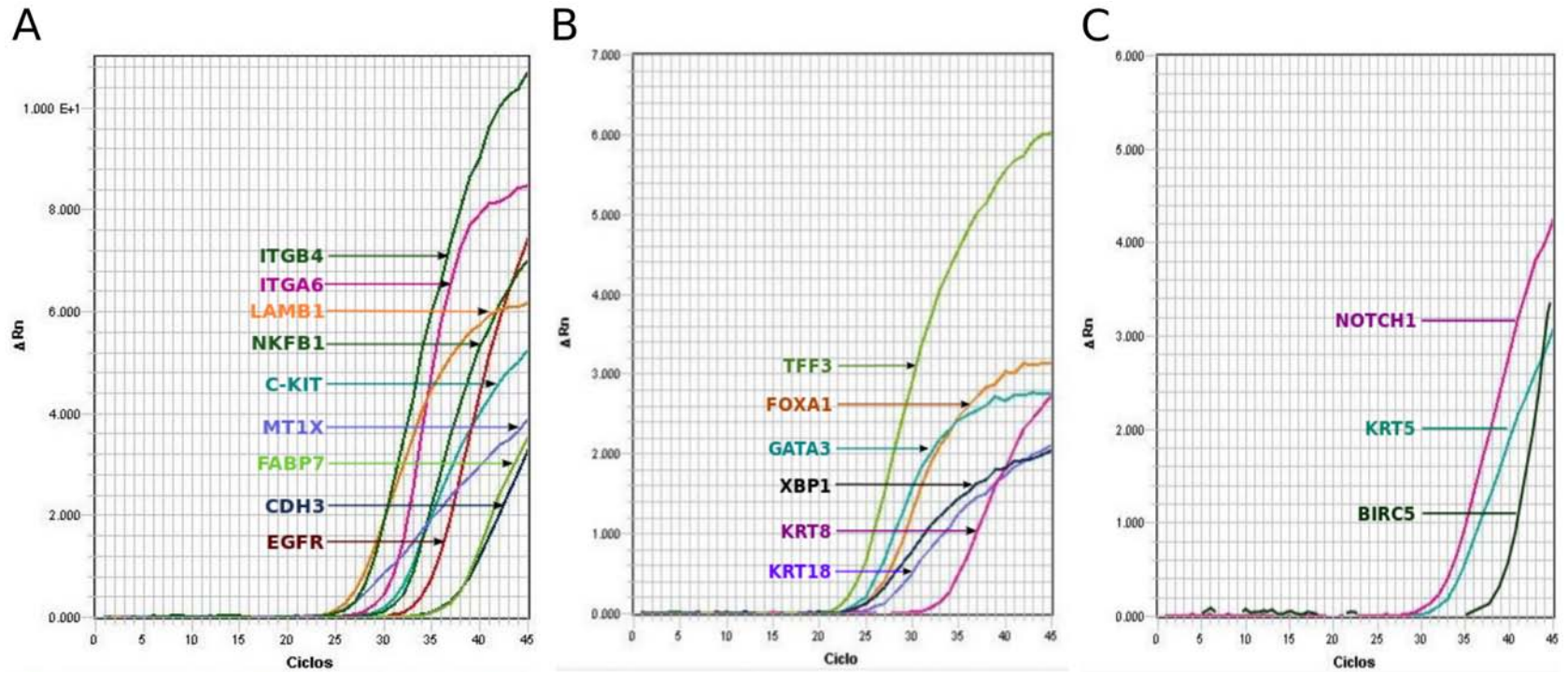


Figura 7.3: A) Marcadores de subtipo Basal. B) Marcadores de subtipo Luminal y C) Marcadores de subtipo Triple Negativo/Basal-like).

Una vez establecida la estandarización de las sondas para este panel se procedió a someter a todas las muestras positivas al panel básico para intentar categorizarlas en alguno de los tres subtipos moleculares, obteniéndose la siguiente serie de datos:

Cuadro 7.4: Resultados de expresión de los marcadores de Origen Tumoral

Muestra	Cáncer de mama tipo Basal									Cáncer de mama tipo Luminal							Cáncer de mama tipo Basal-Like/TN			
	ITG4	LAMB1	C-KIT	ITG6	MT1X	FABP7	CDH3	EGFR	NF κ B1	ESR1	FOXA1	GATA3	KRT8	KRT18	TFF3	XBP1	BIRC5	EGFR2	KRT5	NOTCH1
550	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
687	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
692	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	
758	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
759	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
765	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	
776	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
789	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	
798	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	
810	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
846	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	

KRT17 = Citoqueratina 17, **ITGB4** = Integrina- β 4, **LAMB1** = Laminina β -1, **C-KIT** = v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, **ITGA6** = Integrina β 6, **MT1X** = Metalotioneina 1X, **FABP7** = Proteína de unión a ácidos grasos 7, **EGFR** = Receptor del factor de crecimiento epidérmico, **CDH3** = Cadherina 3, tipo 1, **NF κ B1** = Factor Nuclear κ B, sub-unidad 1, **ESR1** = Receptor de estrógeno tipo 1, **FOXA1** = Forkhead Box A1, **HNF3A** = Factor nuclear de hepatocitos 3- α , **GATA3** = Proteína de unión GATA-3, **KRT8** = Citoqueratina 8, **KRT18** = Citoqueratina 18, **SLC39A6** = Familia de transportadores de solutos 39 (Transportadores de Zinc), miembro 6, **TFF3** = Trefoil Factor 3, **XBP1** = Proteína 1 de unión a la caja X, **HER2**, **V-ERB-B2** o **NEU** = Avian Erythroblastic Leukimia Viral Oncogene Homolog 2, Tyrosine Kinase Type Cell Surface Receptor o Neuroblastoma/glioblastoma Derived Oncogen Homolog, **GRB7** = Growth Factor Receptor-Bound Protein 7 o Epidermal growth factor receptor, **BIRC5** = Baculoviral IAP Repeat Containing 5, **KRT5** = Citoqueratina 5.

Discusión de resultados

8.1. Detección de Células tumorales circulantes

Para satisfacer el primer objetivo del estudio se estableció un panel de tres genes cuya expresión en condiciones no patológicas estuviera preferentemente limitada a la zona mamaria, y cuya expresión se mantuviera después de la transformación a célula tumoral circulante. Se tomaron en cuenta métodos de detección ya establecidos, muchos de los cuales aún se basan en inmunohistoquímica y observamos los inconvenientes que cada uno presenta por separado. Primeramente, que aquellos en EpCAM son poco confiables debido a que algunas CTCs pierden su fenotipo epitelial durante el proceso de transformación epitelial-mesenquimial, lo cual incluye la expresión de EpCAM y algunas citoqueratinas.¹⁴⁹ Considerando los factores anteriores y en vista de la necesidad de desarrollar un procedimiento con la capacidad de permitir la detección de CTCs en etapas subclínicas, y los limitantes de la técnica en sí, se integró un panel de marcadores diagnósticos con la capacidad de detectar la presencia de CTCs a partir de una muestra de sangre. Acorde a la bibliografía y en base a la importancia de ciertos marcadores moleculares, se eligieron los siguientes tres: Mamaglobina A, Citoqueratina 17, y HER2. Una vez aplicados los criterios anteriores se identificaron un total de 11 muestras positivas a CTCs de 1217 analizadas. Estas 11 muestras se establecieron como "positivas a la presencia de CTCs de cáncer de mama".

Mamaglobina-A corresponde a una secretoglobina exclusiva del tejido mamario que se expresa normalmente en el tejido mamario sano, sin embargo, los tumores de cáncer de mama reflejan un aumento en su expresión permitiendo incluso que sea liberada al torrente sanguíneo y se generen anticuerpos, característica que fue de especial utilidad para nuestra meta. Además, su hallazgo en circulación sanguínea es un marcador de mal pronóstico para el paciente relacionado a altas probabilidades de metástasis.¹⁴⁶ Durante

el curso de este estudio se detectaron 11 muestras pertenecientes a pacientes clínicamente sanas que mostraron la expresión de este marcador en la sangre venosa. No hay que soslayar el hecho de que, debido a su alta especificidad, este marcador fue usado como el indicador principal para determinar la presencia de CTCs en las muestras.

Citoqueratina 17 (CK-17) es una citoqueratina que en condiciones de normalidad se expresa en la zona basal del tejido mamario, aumentando su nivel de expresión en los tumores de cáncer de mama, lo que permite que se le relacione con un cáncer de subtipo Basal o Basal Like; aunque el fenotipo del subtipo Basal Like no está completamente estudiado aun. En un análisis de 995 muestras de tumores de cáncer de mama bien caracterizados, se observó que, en el 23% de las muestras se expresaba el marcador CK17.¹⁴⁷ En nuestro caso, de las 11 muestras consideradas como positivas a la presencia de CTCs, 4 fueron positivas a la expresión de CK 17, es decir, un 36% del total de casos sospechosos. Además, no se detectó ninguna muestra que exhibiera CK17 en ausencia de los otros dos marcadores de Identificación, por lo cual consideramos que funciona de manera adecuada como marcador de identificación siempre que se use en conjunto con Mam-A.

HER2 es un receptor con actividad cinasa de tirosina perteneciente a la familia de EGFR relacionado con la proliferación celular. Es útil para establecer las opciones terapéuticas de los pacientes de cáncer de mama, debido a que su expresión condiciona la efectividad de terapias adyuvantes como el Taxol, Trastuzumab, y Lapatinib. Además, es uno de los tres receptores decisivos para clasificar al subtipo triple negativo (EGFR, HER2 Y PROG).⁶³ Pese a las ventajas que reporta la literatura del uso de HER2 como marcador para clasificar el subtipo tumoral y predecir la viabilidad de la terapia adyuvante, en la realización de este estudio el marcador HER2 se empleó principalmente como marcador de identificación de la presencia de CTCs en sangre asignándole una baja prioridad, ya que se encontraron reportes documentados acerca de la expresión de HER2 de manera natural en Leucocitos,¹⁵⁰ lo cual involucra un riesgo de generar un falso positivo debido a que las muestras empleadas en el estudio fueron concentrados leucocitarios y, por lo tanto, la detección de expresión de HER2 puede deberse a los leucocitos y no necesariamente a las CTCs. Así pues, se determinó que, para considerar una muestra que exhibiera el marcador HER2 como positiva a la presencia de CTCs, este marcador debía estar acompañado al menos por uno de los otros dos integrantes del panel. En los resultados observamos que del total de las 1217 muestras que fueron sometidas al panel de identificación 1040 fueron positivas a HER2, pero de las 11 muestras consideradas como positivas, 10 mostraron expresión de HER2. Así, ante la baja selectividad del marcador se sugiere momentáneamente removerlo del panel de detección de CTCs para mantenerlo únicamente como marcador de clasificación tumoral Hay que recordar que las muestras pertenecen a

donadoras de sangre clínicamente sanas lo que resalta la capacidad de detección temprana del método; sin embargo, para determinar por completo la fiabilidad del método, se ha sugerido contactar a las donadoras cuyas muestras se catalogaron como positivas y someterlas a un escrutinio completo que incluya los paneles aquí desarrollados y los métodos tradicionales de diagnóstico de cáncer de mama. La detección de CTCs en sangre mediante este método, permite monitorizar también la respuesta del paciente al tratamiento, pese a que la detección no cuantifica directamente CTCs, sino que se fundamenta en la detección del transcriptoma de los genes de CK-17, MAM-A y HER2 mediante PCR de tiempo real, técnica que permite cuantificar la cantidad de material presente de manera original en la muestra; así, una vez que se obtengan las muestras suficientes en el grupo de casos, se puede realizar una normalización de las curvas de expresión de los genes, y, en base a esto, comparar los niveles de expresión de los marcadores en las muestras de las pacientes, por lo que el hecho de que los niveles de transcripción se mantengan aún después de la terapia sugeriría la persistencia de las células en el torrente circulatorio. Por otra parte es necesario considerar que de las moléculas seleccionadas para el panel ampliado, éstas nos permitieron realizar la siguiente clasificación ver cuadro 7.3, las cuales en base a lo reportado por la bibliografía nos permitirá

- Clasificar en subgrupos de acuerdo al perfil transcripcional de cada caso
- Identificar marcadores pronósticos
- Plantear el empleo de ciertos marcadores moleculares como sugerentes de tratamiento.
- Plantear el método aquí desarrollado como un instrumento de tamizaje que apoye al área médica en la toma de decisiones, sobre todo en pacientes jóvenes que no son candidatas a mastografía o bien en áreas donde no se cuente con el equipo de radioimagen necesario, situaciones donde la toma de muestra de sangre podría ser una excelente opción para su toma, transporte, manejo y extracción, así como de análisis por este método.

8.2. Determinación de origen molecular

Con la llegada de la biología molecular y la mejora de las tecnologías disponibles para la investigación y diagnóstico, se logró categorizar los casos de cáncer de mama en varios subtipos moleculares dependientes de la expresión molecular que cada tumor exhibe. Inicialmente dicha clasificación se realizó mediante inmunohistoquímica, el cual es un método costoso y poco fiable (ya que su interpretación depende por completo del analista), actualmente, las técnicas de PCR en tiempo final, secuenciación, y

microarreglos moleculares son cada vez más accesibles a la vez que mucho más fiables que aquellas que involucran inmunofluorescencia. Con base en estudios de secuenciación y microarreglos moleculares se ha establecido una clasificación de 5 subtipos moleculares, con 3 principales,⁶³ siendo estos:

- luminal (Subtipos A y B)
- Basal.
- Basal Like (Que incluye al Triple Negativo y Claudin-low)

8.2.1. Panel de detección correspondiente a cáncer de mama subtipo Luminal

De acuerdo al estudio de Perou y Sørli, el cáncer de mama tipo luminal se caracteriza por la expresión de los marcadores ESR1, FOXA1, GATA3, TFF3 y XBP1,⁶³ además, nosotros añadimos al panel los marcadores de citoqueratinas 8 y 18 como marcadores auxiliares para el pronóstico de evolución de la enfermedad.

ESR1 Según la literatura, los genes ER son una familia sumamente útil para determinar la agresividad y la posible respuesta frente al tratamiento que cada tumor puede presentar. Particularmente, ESR1 es un gen cuya expresión denota un buen pronóstico para el paciente ya que descarta la posibilidad de que el tumor pertenezca al tipo Triple negativo el cual es de alta agresividad, además, su presencia denota un buen pronóstico pues los tumores que expresan este receptor responden al tratamiento con Tamoxifen, Fulvestrant y otras terapias hormonales. En nuestros resultados, observamos que de las 11 muestras catalogadas como positivas a la presencia de CTCs en el panel de origen expresan este marcador, lo cual nos indica que: Se descarta su pertenencia al grupo basal-like Triple negativo, ya que este grupo de tumores se caracterizan por no expresar los marcadores ESR, HER2 ni PR. Este marcador es el principal determinante para la categorización de un tumor como perteneciente al grupo luminal; de acuerdo a Perou y Sørli, ambos subtipos de este grupo (Luminal a y b) solo se diferencian entre si por el nivel de expresión de ESR1, por ende, las 11 muestras se clasifican dentro del tipo Luminal Las pacientes podrán responder a terapias adyuvantes de tipo hormonal.

FOXA1 La literatura menciona que FOXA1 es un marcador que suele estar ligado a la expresión de ESR ya que refuerza la interacción de ESR1 con la cromatina;¹⁵¹ también actúa como un factor de buen pronóstico ya que su interacción con ESR es necesaria para que el tamoxifen pueda inhibir la proliferación tumoral. Nosotros observamos que, únicamente 2 de las muestras expresaron este marcador, lo cual descarta al tamoxifen

como opción terapéutica de elección en las pacientes restantes y empieza a genera un mal pronóstico para las mismas.

GATA3 GATA3 es un gen que se expresa normalmente en el epitelio luminal mamario¹⁵² y es sumamente importante en el desarrollo placentario, la hematopoyesis y la adipogénesis;^{7, 118} en el cáncer de mama se ha documentado una estrecha relación entre su expresión y la expresión de ESR1⁶³ a través de un sistema autoregulador positivo; además, se sospecha que su expresión disminuye el riesgo de que el tumor genere metástasis ya que revierte la transición epitelial-mesenquimal que es necesaria para dotar de actividad metastásica a las células tumorales.^{153, 154} También se ha observado que GATA3 se expresa en los tumores triple negativo, sin embargo, su función aún no está del todo clara, aunque se intuye que en dicho tipo de cáncer de mama también actúa como un inhibidor de metástasis. Aunque la gran mayoría de los tumores Luminales son positivos para la expresión de este marcador, se han reportado casos en los que esto no se respeta y los tumores, aunque positivos para ESR1, son negativos a GATA3 (Luminal subtipo B).⁶³ Nosotros encontramos que dentro de las muestras positivas (el 91 % son positivas a ESR1), una (el 9 %) es negativa a GATA3 y además es negativa a FOXA1 (muestra 846. Cuadro 7.4), lo cual nos sugiere que dicha muestra puede ser clasificada como Luminal B, mientras que el resto se puede mantener dentro del tipo Luminal A.

TFF3 Los miembros de la familia Trefoil (TFF) son proteínas pequeñas que co-expresan con las mucinas en el tejido epitelial donde intervienen en la protección y reparación de las mucosas.¹⁵⁵ En el cáncer de mama, se observa que su expresión está sumamente ligada a la expresión de ESR1 aumentando en tumores bien diferenciados; hay sospechas de que conforme avanza la patología TFF3 favorece la metástasis.¹⁵⁶ Nuestros resultados reflejan que el 76 % de las muestras con presencia de CTCs presentan expresión de TFF3, con excepción de tres: 692, 798 y 846 (el 24 %).

XBP1 XBP1 es un gen cuya actividad se encuentra presente en la respuesta adaptativa para la supervivencia de las células ante estímulos estresantes,¹⁵⁷ Este mecanismo es el mismo que tiene lugar en los tumores mamarios, donde XBP1 estimula la supervivencia y proliferación de las células tumorales.¹⁵⁸ Su expresión suele estar fuertemente ligada a la expresión de ESR1 y se piensa que ESR1 “recluta” al gen XBP1 para estimular su propia transcripción.¹⁵⁹ También se ha observado su activación en cáncer de mama triple negativo, aunque suele ser poco frecuente. Los resultados del estudio permiten observar que el 91 % de los positivos, salvo la muestra 765 expresan el gen XBP1, lo cual, por un lado correlaciona con el perfil reportado en los estudios de Perou y permite explicar uno de los mecanismos de proliferación tumoral. Ahora bien, en el caso de la muestra 846 induce a pensar en un mal pronóstico ya que esta muestra no expresa los marcadores FOXA1 y

GATA3 que son marcadores favorables, pero si expresa XBP1, lo que sugiere un fenotipo agresivo que no responderá a la terapia con tamoxifen, tiene posibilidades de volverse invasivo (al estar desactivado GATA3) además, tiene activa una vía de supervivencia celular, por lo que puede resistir a otras quimioterapias.

KRT8 y KRT18 Estos marcadores corresponden a genes de citoqueratinas, que se expresan en la porción ductal de la mama y cuya función principal es la adherencia célula-célula. En los procesos carcinogénicos, durante la adquisición de la capacidad invasiva mediante la transformación Epitelial-Mesenquimal la expresión de estas se pierde,¹⁶⁰ por lo cual pueden ser usadas como indicadores de capacidad invasiva del cáncer de mama tipo luminal. Observamos que en el 91 % de las muestras positivas a la presencia de CTCs, la expresión de estas citoqueratinas es positiva (al menos una de ellas), en todas estas muestras el marcador GATA3 se mantiene activo, lo cual coincide con los reportes documentales de que GATA3 revierte la transformación epitelial mesenquimal. Los casos de las muestras 789 y 798 llaman la atención, ya que en estos, aunque GATA3 se encuentra activo, se observa que las citoqueratinas no se están expresando, lo cual podría indicar un proceso invasivo favorecido por TFF3 patrón presente en estas muestras. También se observa que la muestra 846, recurrente de los marcadores anteriores no expresa KRT8 pero si KRT18, lo cual, unido a la ausencia del marcador GATA3 nos lleva a pensar que una transformación epitelial-mesenquimal podría estar teniendo lugar, con la respectiva consecuencia que sugiere invasividad.

Así, con la información obtenida desde el primer gen de este panel sabemos que las 11 muestras positivas pertenecen tienen como origen tumoral al grupo luminal. además, con ayuda de los marcadores auxiliares podemos categorizar a 10 como pertenecientes al grupo *Luminal A* con un buen pronóstico en general; y a una sola muestra (la 846) como perteneciente al grupo *Luminal B* y un mal pronóstico.

8.2.2. Panel de detección correspondiente a cáncer de mama subtipo Basal

Con base en los estudios de Perou y Sorlie (2001), el cáncer de mama tipo basal se caracteriza por no expresar ESR, en cambio presenta altos niveles de expresión de citoqueratinas 5 y 17, lamininas y FABP7, nosotros, además añadimos otros 6 marcadores, cada uno de los cuales tiene una utilidad para complementar la exploración de la patología y que se fueron relacionando de lo particular a lo general. Dado que las muestras se han categorizado como pertenecientes a una patología del tipo luminal, es de esperarse que no cumplan con los criterios de selectividad para formar parte del subtipo basal, sin embargo, los genes contenidos en este panel aún pueden ser usados como auxiliares para el pronóstico de invasividad y resistencia de las células tumorales.

LAMB1 En 1987 Iwamoto y colaboradores⁷⁵ observaron que este gen es una proteína de adhesión propia del basal del tejido epitelial, que en el ambiente tisular no patológico interviene en la adherencia de la célula al lecho del tejido; correspondiendo con estas observaciones, Perou en 2001 determino que el gen es uno de los marcadores característicos de los carcinomas mamarios de tipo basal, por lo cual es de esperarse que en un carcinoma mamario tipo luminal este marcador no esté expresado, en nuestros resultados vemos confirmado esto ya que ninguna de las muestras expresó este marcador.

KRT5 Ya en 1988 Lersch y Fuchs¹⁶¹ reportaron que la citoqueratina 5 se expresa como proteína de adhesión en el epitelio escamoso estratificado, más tarde, en 1989, Trask y su equipo observaron que ésta citoqueratina se expresa en el epitelio basal de la mama, curiosamente, en el estudio de Trask se reporta que la expresión de KRT5 es mucho mayor en tejido sano y disminuye hasta desaparecer en la transformación tumoral.¹⁶² Finalmente, Perou reporta, en 2001 que KRT5 se expresa en tumores mamarios de origen celular basal. Por nuestra parte, en nuestros resultados observamos que KRT5 se expresa en una sola de las muestras clasificadas como positivas a la presencia de CTCs, lo cual, al clasificarlas como células tumorales circulantes de origen basal, concuerda con las observaciones de Perou, y a medias con las de Trask, ya que, al ser células de origen luminal no deben expresar este marcador selectivo para la zona basal. La expresión del marcador en una de nuestras muestras es discordante con los estudios, ya que la muestra en cuestión expresa todos los marcadores distintivos de la zona luminal y únicamente KRT5 de la zona basal, lo que nos lleva a pensar en la heterogeneidad del tumor puede entrar en juego para explicar este comportamiento anómalo.

KRT17 En 1990, Trask observó que la citoqueratina 17 se expresa en el tejido epitelial basal de la mama;¹⁶² siguiendo esta línea, en 2001, Perou la estableció como un marcador molecular específico del cáncer de mama de origen basal.⁶³ De acuerdo a lo anterior, nuestras muestras clasificadas como positivas a CTCs de tipo luminal idealmente no deberían expresar el marcador. Sin embargo, observamos que se presenta en 4 de las 11 muestras, pese a lo cual no cambiamos su clasificación, debido a que cumplen con el principal criterio de selección del subtipo luminal (la expresión de ESR1), y apenas con dos criterios de importancia media para el subtipo basal; sin embargo, esta decisión no cierra la puerta a una posible heterogeneidad del tumor, simplemente nos lleva a pensar que la principal población tumoral es de origen luminal, pudiendo ocurrir que haya una segunda población de tipo basal.

FABP7 FABP7 es un gen que se expresa de manera normal en las células basales del epitelio mamario,^{163, 164} por lo cual, el hecho de que ninguna de nuestras muestras lo expresen es congruente, dado que las mismas han sido categorizadas como pertenecientes al

subtipo celular luminal A. Pese a que en los resultados obtenidos no se usa este marcador, hay que mencionar que fue incluido en el panel como un auxiliar ya que, gracias a los estudios de Shi y Wang, se sabe que este gen aumenta su expresión en los cancer de mama de tipo basal y Basal-like, en los cuales además juega un papel protector, ya que inhibe la proliferación tumoral¹⁶³ y favorece la diferenciación celular al mediar la vía de señalización JAK/Stat.¹⁶⁵ Por otro lado, se ha observado que en otras patologías, como los melanomas y los gliomas su sobreexpresión correlaciona con una mayor proliferación tumoral, lo que conlleva a un mal pronóstico para los pacientes.¹⁶⁶

ITG β 4 e ITG α 6 Como se describió anteriormente, la mama se manetiene como un órgano en sí misma gracias a una arquitectura que inicia su desarrollo desde el periodo embrionario. Particularmente, las integrinas toman una gran importancia en la morfogénesis de las estructuras mamarias, la expresión coordinada de ITG β 4 e ITG α 6 conecta las lamininas de la membrana basal a la matriz extracelular anclandose a los Hepidesmosomas del tejido mioepitelial dotando así de polaridad y adhesión a las células basales.¹⁶⁷ Sin embargo, en el cancer de mama, las células tumorales pierden su polaridad y su organización estructural, esto debido a que el complejo ITG β 4/ITG α 6 interacciona con HER2 para favorecer la proliferación y la capacidad invasiva tumoral.^{168, 169} En el cancer de mama Basal o Basal-like, se ha observado que la sobreexpresión de ITG β 4 interacciona con CDH3 para aumentar la invasividad y agresividad del tumor.¹⁷⁰ Finalmente, se tiene constancia de que ITG β 4 cuando se combina con la acción de HER2 o EGFR promueve resistencia a la quimioterapia con Tamoxifen y su acción combinada con NF κ β 1 provoca resistencia a la radioterapia.^{171, 172} De acuerdo a la investigación documental que tenemos y se ha resumido en los párrafos anteriores, se podría considerar la expresión del complejo ITG β 4/ITG α 6 como marcadores de mal pronóstico, sin embargo hay que tener en cuenta algunos factores:

- Que estas interpretaciones son específicas para cáncer de mama tipo basal, por lo que no pueden ser usados para nuestras muestras, ya que fueron catalogadas como pertenecientes al subtipo Luminal. El haber encontrado positivo la expresión del complejo puede deberse a la presencia de células epiteliales de la membrana basal pertenecientes al sitio de la punción, donde también se expresa el complejo.
- En caso de que nuestras muestras fueran de tipo basal, el mal pronóstico relacionado a estos marcadores depende de una co-expresión con otros marcadores, no se da de manera independiente, por lo que la interpretación se debe realizar en base a la expresión de HER2, CDH3 y EGFR.
- Finalmente, para el complejo de integrinas, su actividad como oncogenes viene dada por su sobreexpresión, por lo que una interpretación de cualitativa como la usada

en este trabajo no es determinante para definir un mal pronóstico en las pacientes donde son detectadas.

Por lo anterior, la expresión de las integrinas en nuestras muestras no aporta información concluyente para nuestros pacientes; además se sugiere que el complejo de integrinas no se aplique en un panel de expresión absoluta.

Panel de detección correspondiente a cáncer de mama Triple Negativo

La característica descriptiva de este grupo de tumores mamarios es precisamente el que no expresan los genes de Progesterona, HER2 ni ESR1. Nuestro estudio tiene dos de estos tres genes contemplados: ESR1 y HER2, que fueron encontrados, sin excepción en todas las muestras donde se detectó la presencia de CTCs, y, dado que basta con la presencia de uno solo de ellos para descartar a este grupo se puede afirmar que ninguna de las muestras detectadas positivas tienen como grupo de origen tumoral al cáncer de mama triple negativo, que se conoce como el más agresivo y con el peor pronóstico.

Capítulo 9

Conclusiones

El método propuesto, permite detectar muestras positivas a la presencia de Células Tumoraes Circulantes (CTCs) en una población femenina abierta. Además, de poder realizar una clasificación de las mismas de acuerdo a su origen celular para así proponer posibles escenarios de evolución de la patología, y finalmente, predecir la respuesta a ciertos tratamientos y por ende elegir la mejor estrategia terapéutica a seguir.

Capítulo 10

Perspectivas

Se propone:

- Realizar un seguimiento epidemiológico a las donadoras cuyas muestras fueron positivas, para monitorizar su evolución y constatar las predicciones arrojadas por el proyecto, buscando brindarles atención oportuna.
- Realizar un estudio de validación y estandarización para este método, contrastando los perfiles moleculares de sujetos sanos, pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, y con otras afecciones benignas mamarias.
- Realizar un estudio control, para observar el comportamiento de las CTCs presentes en sangre de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, antes, durante y después del tratamiento.

Bibliografía

- [1] **National Cancer Institute**, Qué es el cáncer?. *National Cancer Institute.*, **2013**: Disponible en <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
- [2] **World Health Organization**, Cáncer. *World Health Organization.*, **2013**: Disponible en <http://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- [3] **Mahoney MC, Bevers T, Linos E, Wilett WC.**, Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *Ca Cancer J Clin.*, **2008**: 2008;58:347-371.
- [4] **Globocan**, Fact sheets by Cancer. *Globocan.*, **2012**: Disponible en http://globocan.iarc.fr/pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- [5] **Cárdenas J., Bargalló E., Erazo, Aura, Maafs, E.**, Quinta revisión del Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario de 2013. *Elsevier*, **2013**: Disponible en <http://consensocancermamario.com/publicaciones.html>.
- [6] **Knaul F., López-Carrillo L., et al.**, México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia. Informe final. Primera edición. *Fundación Mexicana para la Salud*, **2009**.
- [7] **Arce,C., Bargalloó, E., et al.**, Cáncer de mama. *Cancerología*, **2011**: 77-86.
- [8] **Instituto Nacional de Estadística y Geografía**, Estadísticas a propósito del día internacional contra el Cáncer de mama. *INEGI.*, **2013**
- [9] **Hernández M. et al.**: NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama., *DOF*, **2011**; Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011.
- [10] **Directorio General de Salud Reproductiva.**: Compendio de patología mamaria., **1ª Ed.**, México: *Secretaría de salud*, **2002**
- [11] **American Cancer Society**, ¿Cuál es la diferencia entre un mamograma de detección y un mamograma de diagnóstico?. *American Cancer Society*, **Citado 6 Enero 2015**: Disponible en <http://www.cancer.org/espanol>
- [12] **Boletín Oncológico**, Boletín Oncológico: Clasificación BI-RADS [Internet]. *Boletín Oncológico del área de Teruel*, **Citado 8 Enero 2015**: Disponible en <http://www.boloncol.com/boletin-26/clasificacion-bi-rads-2.html>
- [13] **American Cancer Society**, Cómo entender su informe de mamograma: categorías BI-RADS [Internet]. *American Cancer Society*, **Citado 13 Enero 2015**: Disponible en <http://www.cancer.org/espanol>
- [14] **American Cancer Society.**: Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014., **1ª Ed.**, Atlanta: *American Cancer Society, Inc.*, **2013**
- [15] **Breast. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al.**, eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76.
- [16] **Yeatman TJ, Cantor AB, Smith TJ, et al.**: Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Ann Surg*, **1995**:222(4):549-59; discussion 559-61.
- [17] **Chaney AW, Pollack A, McNeese MD, et al.**: Primary treatment of cystosarcoma phyllodes of the breast. *Cancer*, **2000**:89 (7):1502-11.
- [18] **Carter BA, Page DL**: Phyllodes tumor of the breast: local recurrence versus metastatic capacity. *Hum Pathol*, **2004**:35(9):1051-2.

- [19] **Dean L, Geschicker CF**: Comedo carcinoma of the breast *Arch Surg.*, **1938**;36:225
- [20] **Wellings SR, Jensen HM**: On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast, *JNCI*, **1973**, 50:1111
- [21] **Page DL, Anderson TJ, Rogers LW**: How should we categorize breast cancer?, *Breast*, **1993**, 2:217
- [22] **Lennington WJ et al**: Ductal carcinoma in situ of the breast: heterogeneity of individual lesions, *Cancer*, **1994**, 73:118
- [23] **Page DL, Rogers Lwl**: Combined histologic and cytologic criteria for the diagnosis of mamary atypical ductal hyperplasia, *Hum Pathol*, **1992**, 23:1095
- [24] **Azzopardi JG**: Problems in breast pathology, 1^a Ed., WB Saunders, **1979**, Philadelphia
- [25] **Kirby I. Bland, Edward M. Copeland III**: La mama: Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas, 3^a Ed., Buenos Aires: *Médica Panamericana*, **2007**
- [26] **Rosen PP, Scott M**: Cystic hypersecretory duct carcinoma of the breast, *Am J Surg Pathol*, **1984**, 8:31
- [27] **Arias-Setlla J**: Atypical endometrial changes produced by chorionic tissue, *Hum Pathol*, **1972**, 3:450
- [28] **Liberman L, et al**: Mammographic features of local recurrence in women who have undergone breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ, *Am J Roentgenol*, **1997**, 168:489
- [29] **Dixon AR, et al**: Paget's Disease of the nipple, *Br J Surg*, **1991**;72:722
- [30] **Lagios MD, et al**: Paget's Disease of the nipple: alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma *Cancer*, **1984**;54:545
- [31] **Carter D, Orr SL, Merino MJ**: Intracystic papillary carcinoma of the breast: after mastectomy, radiotherapy or excisional biopsy alone, *Cancer*, **1983**;52:14
- [32] **Corkill ME, et al**: Fine-needle aspiration cytology and flow cytometry of intracystic papillary carcinoma of breast, *Am J Clin Pathol*, **1990**;94:673
- [33] **Estabrook A, et al**: Mammographic features of intracystic papillary lesions, *Surg Gybecol Obstet*, **1990**;170:113
- [34] **Foote FW, Stewart FW**: Lobular carcinoma in situ, *Am J Pathol*, **1941**; 14:491.
- [35] **Winchester DJ, et al**: Tubular carcinoma of the breast: predicting axillary nodal metastases and recurrence, *Ann Surg*, **1996**; 223:342.
- [36] **Elson BC, et al**: Tubular carcinoma of the breast: mode of presentation, mammographic appearance, and frequency of nodal metastases, *AJR Am J Roentgenol*, **1993**; 161:1173.
- [37] **Rajakariar R, Walker RA**: Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast cancer, *Br J Cancer*, **1995**; 71:150.
- [38] **Cooper HS, Patchefsky AS, Krill RA**: Tubular carcinoma of the breast, *Cancer*, **1978**; 42:2334.
- [39] **Page DL, Anderson TJ, Sakamoto G**: Diagnostic histopathology of the breast, 1^a Ed., Edinburgh: *Churchill Livingstone*, **1987**.
- [40] **Page DL, et al**: Invasive cribriform carcinoma of the breast, *Histopathology*, **1983**; 7:525.
- [41] **Komari K, et al**: Mucinous Carcinoma of the breast in Japan: a prognostic analysis based on morphologic features, *Cancer*, **1988**; 61:989.
- [42] **Wilson TE, et al**: Pure and mixed mucinous carcinoma of the breast: pathologic basis for differences in mammographic appearance, *AJR Am J Roentgenol*, **1995**; 165:285.
- [43] **Diab SG et al**: Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous carcinomas, *J Clin Oncol*, **1999**; 17:1442.
- [44] **Quincy C, et al**: Intracytoplasmic lumen: a useful diagnostic feature of adenocarcinomas, *Histopathology*, **1991**; 19:83.
- [45] **Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG**: Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation, *Hum Pathol*, **1992**; 23:655.
- [46] **du Toit RS, et al**: Invasive lobular carcinomas of the breast: the prognosis of histopathological subtypes, *Br J Cancer*, **1989**; 60:605.
- [47] **Bex G, et al**: E-cadherin is inactivated in a majority, *Br J Cancer*, **1989**; 60:605.
- [48] **Dixon JM, et al**: Infiltrating lobular carcinoma of the breast: an evaluation of the incidence and consequence of bilateral disease, *Br J Surg*, **1983**; 70:513.
- [49] **Schnitt SJ et al**: Influence of infiltrating lobular histology on local tumor control in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiotherapy, *Cancer*, **1989**; 64:448.

- [50] **Eisinger F, et al:** Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited, *Cancer Res*, **1998**; 58:1588.
- [51] **Lakhani SR:** The pathology of familial breast cancer: morphologic aspects, *Breast Cancer Res*, **1991**; 1:31.
- [52] **Pedersen L, et al:** Medullary carcinoma of the breast: prevalence and prognostic importance of classical risk factors in breast cancer, *Eur J Cancer*, **1995**; 31A:2289.
- [53] **Gersell D, Katzenstein AL:** Spindle cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic and ultrastructural study, *Hum Pathol*, **1981**; 12:550.
- [54] **Bauer TW, et al:** Spindle Cell carcinoma of the breast: four cases and review of the literature, *Hum Pathol*, **1984**; 15:147.
- [55] **Cowie AT:** Overview of mammary gland, *J Invest Dermatol*, **1974**; 63:2.
- [56] **Radnor CJP:** Myoepithelium in the prelactating and lactating mammary glands of the rat, *J Anat (Lond)*, **1972**; 112:337.
- [57] **Stampfer MR, Yaswen P:** Culture systems for study of human mammary epithelial cell proliferation, differentiation and transformation, *Cancer Surv*, **1993**; 18:7.
- [58] **Verhoeve D, Van-Marck E:** Proliferation; basementmembrane changes, metastasis and vascularization patterns in human breast cancer, *Pathol Res Pract*, **1993**; 189:851.
- [59] **Neville MC, Daniel CW:** The mammary gland development, regulation and function, **1^a Ed.**, New York: *Plenum Press*, **1987**
- [60] **Prat A, Parker J, Karginova O, et al:** Phenotypic and molecular characterization of the Claudin-low Intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2010**; 12:R68.
- [61] **Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al:** Molecular Classification of Cancer: Class discovery and class prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, **1999**; 286:531.
- [62] **Hedenflak I, Duggan D, Chen Y, et al:** Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*, **2001**; 344(8):539.
- [63] **Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al:** Gene Expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, **2000**; 98(19):10869.
- [64] **Corvalán A, et al:** Perfiles de expresión génica en decisiones terapéuticas en cáncer de mama. *Rev méd Chile*, **2007**; 135:257-63.
- [65] **Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al:** How basal are triple-negative breast cancers?. *IJC*, **2008**; 1;123(1):236-40.
- [66] **Troyanovsky SM, Leube RE, Franke WW:** Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern, *Eur J Cell Biol*, **1992**.
- [67] **Kim S, Wong P, Coulombre PA:** A keratin cytoskeletal protein regulates proteins synthesis and epithelial cell growth, *Nature*, **2006** 441:362.
- [68] **Suzuki S, Naitoh Y:** Amino acid sequence of a novel integrin beta-4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells, *EMBO J*, **1990**.
- [69] **Hogervost F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A:** Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118kd cytoplasmic domain, *EMBO J*, **1990**, 9:765.
- [70] **Vidal F, Aberdam D, Miquel C, et al:** Integrin beta-4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia, *Nature Genet*, **1995**, 10:229.
- [71] **Shaw LM, Rabinovitz I, et al:** Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha-6/beta-4 integrin promotes carcinoma invasion, *Cell*, **1997**.
- [72] **Burgeson RE, Chiquet M, et al:** A new nomenclature for the laminins, *Matrix Biol*, **1997**; 14:209.
- [73] **Elliott RW, Barlow D, Hogan BL:** Linkage of genes for laminin β -1 and β -2 subunits on chromosome 1 in mouse, *In Vitro Cell Dev Biol*, **1985**; 21:477.
- [74] **Modi WS, Jaye M, O'brien SJ:** Chromosomal localization of a cDNA clone for the human β 1 laminin chain, *Cytogenet Cell Genet*, **1987**; 46:663.
- [75] **Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, et al:** YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation, *Science*, **1987**; 239:245.
- [76] **Vanderbark GR, de Castro CM, Taylor H, et al:** Cloning and structural analysis of the human c-kit gene, *Oncogene*, **1992**; 7:1259.
- [77] **Kasamatsu S, Hachiya A, Higuchi K, et al:** Production of the soluble form of KIT, s-KIT, abolishes stem cell factor induced melanogenesis in human melanocytes, *J Invest Dermatol*, **2008**; 128:1763.

- [78] **Mani M, Venkatasubrahmanyam S, Sanyal M, et al:** Wiskott-Aldrich syndrome protein is an effector of Kit signaling, *Blood*, **2009**; 114:2900.
- [79] **West AK, Eddy RL, Henry WM, et al:** Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16, *PNAS*, **1990**; 8:513.
- [80] **Johns Hopkins University:** OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, **updated 2015**; Disponible en <http://omim.org/>.
- [81] **Ensembl:** Homo sapiens - Summary, *Ensembl Genome Browser*, **2015**; Disponible en <http://www.ensembl.org/>.
- [82] **Aceview:**The AceView genes, *NCBI*, **2012**; Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Aceview/index.html>.
- [83] **Uniprot:**The Universal Protein Resource, *UniProt*, **2014**; Disponible en <http://www.uniprot.org/>.
- [84] **GeneCards:**The Human Gene Compendium, *Weizmann Institute of Science*, **2014**; Disponible en <http://www.genecards.org/>.
- [85] **Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H, et al:** Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP), *BBA*, **1997**; 1354:24.
- [86] **Liang, Y., Diehn, M., Watson, N., et al:** Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme., *PNAS*, **2005**; 102: 5814-5819.
- [87] **Shimizu N, Behzadian MA, Shimizu Y:** Genetics of cell surface receptors for bioactive polypeptides: binding of epidermal growth factor is associated with the presence of human chromosome 7 in human-mouse cell hybrids, *PNAS*, **1980**; 77:3600.
- [88] **Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, et al:** Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms, *Genomics*, **2001**; 96:128.
- [89] **Kondo I, Shimizu N:** Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7, *Cytogenet Cell Genet*, **1983**; 35:9.
- [90] **Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, et al:** The EpS8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5, *Nature*, **2000**; 408:374.
- [91] **Sorensen OE, Thapa DR, Roupe KM, et al:** Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor, *JCI*, **2006**; 116:1878.
- [92] **Kremmidiotis G, Baker E, Crawford J, et al:** Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity, *Genomics*, **1998**; 49:467.
- [93] **Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., et al:** Molecular cloning of a human Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues., *JCB*, **1989** ; 109: 1787-1794.
- [94] **Soler AP, Russo J, Russo IH, et al:** Soluble fragment of P-cadherin adhesion protein found in human milk, *J Cell Biochem*, **2002**; 85:180.
- [95] **Albergaria A, Ribeiro AS, Pinho S, et al:** ICI 182,780 induces P-cadherin overexpression in breast cancer cells through chromatin remodelling at the promoter level: a role for C/EBP β in CDH3 gene activation, *Hum Molec Genet*, **2010**; 19:2554.
- [96] **Liptay S, Schmid RM, Perkins ND, et al:** Related subunits of NK-kappa-B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2, *Genomics*, **1992**; 13:287.
- [97] **Heron E, Deloukas P, van Loon APGM:** The complete exon-intron structure of the 156-kb human gene NFKB1, which encodes the p105 and p50 proteins of transcription factors NF-kappa-B and I-kappa-B-gamma: implications for NF-kappa-B-mediated signal transduction., *Genomics*, **1995**; 30:493.
- [98] **Meyer R, Hatada EN, Hohmann HP, et al:** Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa-B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha, *PNAS*, **1991**; 88:966.
- [99] **Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, et al:** Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression, *Nature*, **2003**; 423:655.
- [100] **Hiscott J, Kwon H, Genin P:** Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappa-B pathway. *J Clin Invest*, **2001**; 107:143.
- [101] **Reuter U, et al:** Nuclear factor-kappa-B as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol*, **2002**; 51:507.
- [102] **Park BK, et al:** NF-kappa-B in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nature Med*, **2007**; 13:62.

- [103] **Flouriôt G, et al:** Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO*, **2000**; 19:4688.
- [104] **Kos M, et al:** Genomic organization of the human ER-alpha gene promoter region. *Molec Endocr*, **2001**; 15:2057.
- [105] **Metzger D, White JH, Chambon P:** The human oestrogen receptor function in yeast. *Nature*, **1988**; 334:31.
- [106] **Shupnik MA, et al:** Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocr Metab*, **1998**; 83:3965.
- [107] **Pelletier G, El-Alfy M:** Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocr Metab*, **2000**; 85:4835.
- [108] **Fan S, et al:** BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science*, **1999**; 284:1354.
- [109] **Wei, X., Xu, H., Kufe, D.:** MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Molec. Cell*, **2006**; 21: 295-305.
- [110] **Hurtado A, et al:** Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*, **2008**; 456:1168.
- [111] **Mincheva, A., Lichter, P., Schutz, G., et al:** Assignment of the human genes for hepatocyte nuclear factor 3-alpha, -beta, and -gamma (HNF3A, HNF3B, HNF3G) to 14q12-q13, 20p11, and 19q13.2-q13.4. *Genomics*, **1997**; 39: 417-419.
- [112] **Clark GM, McGuire WL:** Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol*, **1988**; 15 (supl 1):20.
- [113] **Kaestner KH, et al:** The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics*, **1994**; 20:337.
- [114] **Hurtado A, et al:** FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nature Genet*, **2011**; 43:27.
- [115] **National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine:** Gene, updated **2015**; Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- [116] **Siegel MD, et al:** Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cell requires the GATA-3 and C/EBP elements. *J Biol Chem*, **1995**; 270:24548.
- [117] **Zheng, W., Flavell, R. A.:** The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for the Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **1997**; 89: 587-596.
- [118] **Tong Q, et al:** Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*, **2000**; 290:134.
- [119] **Kouros-Mehr H, et al:** Gata-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*, **2006**; 127:1041.
- [120] **Krings G, et al:** Diagnostics utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*, **2014**; 45(11):2225.
- [121] **Waseem A, et al:** Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biologist*, **1990**; 2:464.
- [122] **Kulesh DA, Oshima RG:** Complete structure of the gene for human keratin 18. *Genomics*, **1989**; 4:339.
- [123] **Taylor KM, Nicholson RI:** The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *BBA*, **2003**; 1611:16.
- [124] **Taylor KM, et al:** Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J*, **2003**; 375:51.
- [125] **Manning DL, et al:** Effects of oestrogen on the expression of a 4.4kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Molec Cell Endocr*, **1988**; 59:205.
- [126] **Schmitt H, et al:** A third P-domain peptide gene (TFF3), human intestinal trefoil factor, maps to 21q22.3. *Cytogenet Cell Genet*, **1996**; 72:299.
- [127] **Paulsen FP, et al:** Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem*, **2008**; 283:13418.
- [128] **Liou HC, et al:** An HLA-DR-alpha promoter DNA-binding protein is expressed ubiquitously and maps to human chromosomes 22 and 5. *Immunogenetics*, **1991**; 34:286.
- [129] **Chen X, et al:** XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1-alpha pathway. *Nature*, **2014**; 508:103.
- [130] **Iwakoshi NN, et al:** Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nature Immun*, **2003**; 4:301.

- [131] **ILee, A.-H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., et al:** Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, **2008** ; 320: 1492-1496.
- [132] **Anderson LA, et al:** High-density genetic map of the BRCA1 region of chromosome 17q12-q21. *Genomics*, **1993**; 17:618.
- [133] **Di Fiore, et al:** erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, **1987**; 237:178.
- [134] **Van de Vijver, et al:** NEU-protein overexpression in breast cancer association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *New Eng J Med*, **1988**; 319:1239.
- [135] **Pegram MD, et al:** The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*, **1997**; 15:537.
- [136] **Mehta RR, et al:** Plasma c-erbB2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol*, **1998**; 16:2409.
- [137] **Yu D, et al:** Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Molec Cell*, **1998**; 2:581.
- [138] **Pradip D, Bouzyk M, Dey N, et al:** Dissecting GRB7-mediated signals for proliferation and migration in HER2 overexpressing breast tumor cells: GTP-ase rules. *AJCR*, **2013** ; 3(2):173-195.
- [139] **Stein D, et al:** The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *EMBO*, **1994**; 13:1331.
- [140] **Ambrosini G, et al:** Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*, **1998**; 273:11177.
- [141] **Li F, et al:** Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **1998**; 396:580.
- [142] **You F1, Roberts LA, Kang SP, Nunes RA, Dias C, Iglehart JD, Solomon NA, Friedman PN, Harris LN.,** Low-level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *J Hematol Oncol*. **2008**;28;1:2.
- [143] **Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, Zhang X, Reed SG, Persing D, Houghton RL.,** Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem.*, **2002**;48(8):1225-31.
- [144] **Golub TR, et al.:** Molecular Classification of Cancer: Class discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, **1999**; 286:531.
- [145] **Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.:** Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, **2004**; 351(8):781.
- [146] **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(13):3028-31.
- [147] **Alshareeda AT, Soria D, Garibaldi JM, Rakha E, Nolan C, Ellis IO, et.al.:** Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, **2013**; 139(1):23-37.
- [148] **Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, et al.:** Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2004**; 10(24):8185.
- [149] **Kalluri R:** EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *JCI*, **2009**; 119:1417.
- [150] **AFanglei You, Lisa A Roberts, S Peter Kang, et al.:** Low-level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *JHO*, **2008**; 1:2.
- [151] **Carroll JS, Brown M.:** Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, **2006**; 20:1707-14.
- [152] **Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, et al.:** Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol*, **2007**; 9:201-9.
- [153] **Elmar Putz, Klaus Witter, Sonja Offner, et al.:** Phenotypic Characteristics of Cell Lines Derived from Disseminated Cancer Cells in Bone Marrow of Patients with Solid Epithelial Tumors. Establishment of Working Models for Human Micrometastases. *Cancer Res.*, **1999**; 59:241.
- [154] **Kouros-Mehr, Hosein et al.:** GATA-3 Links Tumor Differentiation and Dissemination in a Luminal Breast Cancer Model. *Cancer Cell*, **2008**; 13:141-152.
- [155] **May FEB, Westley BR.:** Trefoil proteins: their role in normal and malignant cells. *J Pathol*, **1997**; 183:4-7.

- [156] **Ahmed, Ahmed R.H. et al.:** TFF3 Is a Normal Breast Epithelial Protein and Is Associated with Differentiated Phenotype in Early Breast Cancer but Predisposes to Invasion and Metastasis in Advanced Disease., *AJP*, **2011**; 180:904-916.
- [157] **Yoshida, H., Uemura, A., Mori, K.:** pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell Struct. Funct.*, **2009**; 34:1-10.
- [158] **Xi Chen, Dimitrios Iliopoulos, et al.:** XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, **2014**; 508:103-107.
- [159] **Ding I, Yan J, et al.:** Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog. Cell Cycle Res.*, **2003**; 5:441-446.
- [160] **Thierry JP.:** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.*, **2002**; 2:442-454.
- [161] **Lersch R, Fuchs E:** Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells. *Molec. Cell. Biol.*, **1988**; 8: 486-493.
- [162] **Trask, D. K., Band, V., Zajchowski, D. A., et. al.:** Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *PNAS*, **1990**; 87: 2319-2323.
- [163] **Shi YE, Ni J, Xiao G, Liu YE.:** Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG. *Cancer Res*, **1997**; 57(15):3084.
- [164] **Hauerland NH, Spener F.:** Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*, **2004**; 43(4):328349.
- [165] **Wang M, Liu YE, Ni J, Aygun B, Goldberg ID, Shi YE.:** Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res*, **2000**; 60(22):6482–6487.
- [166] **Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, et al.:** IABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *CJN*, **2007**; 84(3):245-248.
- [167] **Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, et al.:** Integrin $\alpha 6 \beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *JCB*, **1991**; 113:907-917.
- [168] **Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, et al.:** $\beta 4$ integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, **2002**; 2:205-216.
- [169] **Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, et al.:** $\beta 4$ integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell*, **2006**; 126:489-502.
- [170] **Vieira AF, Ribeiro AS, Dionísio MR, et al.:** P-cadherin signals through the laminin receptor $\alpha 6 \beta 4$ integrin to induce stem cell and invasive properties in basal-like breast cancer cells. *Oncotarget*, **2014**; 5:679-692.
- [171] **Nam JM, Ahmed KM, Costes S, et al.:** $\beta 1$ -integrin via NF- $\kappa \beta$ signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2013**; 15:R60.
- [172] **Folgiro V, Avetrani P, Bon G, et al.:** Induction of ErbB-3 expression by $\alpha 6 \beta 4$ integrin contributes to tamoxifen resistance in ER $\beta 1$ -negative breast carcinomas. *PLoS One*, **2008**; 3:e1592.

Apéndice **A**

Carta de consentimiento informado



ISSSTE "Identificación de Células TumORAles Circulantes, de Cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas, que acuden a donar sangre".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

"Identificación de Células TumORAles Circulantes, de Cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas, que acuden a donar sangre".

Por favor, lea detenidamente la siguiente carta y tómesese el tiempo necesario para decidir si está de acuerdo o no, en participar en este proyecto. Pregunte libremente cualquier duda que pueda tener, al personal médico que le haya proporcionado esta información.

El proyecto de "Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas, que acuden a donar sangre" tiene como objetivo emplear una prueba de laboratorio con la que se pretende demostrar que es posible identificar genes que caracterizan a las células tumorales circulantes, en etapas subclínicas de la enfermedad. El proyecto está coordinado por la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla, personal adscrito al Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital "Regional 1° de Octubre". Este proyecto cuenta con la aprobación de los Comités de Ética e Investigación del Hospital Regional "1° de Octubre". Estos Comités rigen a los investigadores para que desarrollen sus estudios siguiendo siempre las pautas éticas y legales aplicables.

Se me ha explicado, que mi participación consistirá en: 1) donar una muestra de 20 mL de sangre 2) saber que yo no realizare gasto alguno, 3) que no recibiré ninguna remuneración económica por mi participación en este estudio, 4) que es responsabilidad del médico, el responder las preguntas que normalmente realizamos en una consulta y 5) que los beneficios de éste estudio, no serán inmediatos, sino a futuro.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los procedimientos y posibles riesgos, inconvenientes y molestias de mi participación en el proyecto, que son los siguientes:

1. Por la toma de sangre, un hematoma o morete y dolor en el lugar del piquete de la aguja, que de ser necesario será atendido por el personal médico del hospital.
3. Por la sangre, ninguna.

Así mismo entiendo que me reservo el derecho de retirarme o retirar mis muestras biológicas, en el momento que yo creyese conveniente, sin que esto afecte la atención médica que recibo o recibe mi familiar en el instituto. Para la revocación de su consentimiento, deberá dirigirse por escrito a la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla al Email: thompson_068@hotmail.com o al teléfono Tel. 51415300 a la Extensión 16610, de lunes a viernes de las 8:00 a las 14:00 h.

Además hago saber que se me ha preguntado, si consiento que mi muestras biológicas sean empleadas en otros estudios relacionados con el cáncer y para ello mis muestras serán almacenadas por un periodo de 15 años, a -80° C, en los ultra-congeladores del Servicio de Medicina Genómica del Hospital "Regional 1° de Octubre" del ISSSTE en México, DF., a partir de la toma de muestra y que pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal, se ha comprometido a orientarme oportunamente sobre



ISSSTE "Identificación de Células Tumorales Circulantes, de Cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas, que acuden a donar sangre".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

cualquier procedimiento alternativo que pudiese ser ventajoso para mi tratamiento, así como también a responder cualquier pregunta y a aclarar las dudas que yo planteé sobre los procedimientos que se llevaran a cabo, tales, como los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación, como por ejemplo orientar a aquella participante en la que identificáramos los marcadores moleculares que asocian con células tumorales circulantes; para que quien no sea derechohabiente a nuestra H. Institución, pueda recibir la orientación de las posibles instituciones a donde podría dirigirse para su seguimiento y en caso de ser derechohabiente, se le asignará al servicio correspondiente para que sea vigilada y tratada, según se requiera.

El investigador principal ha brindado las seguridades de que no se me identificará en las presentaciones, o publicaciones derivadas de los resultados del estudio y que los datos relacionados con mi identidad serán manejados con absoluta confidencialidad. Para dar cumplimiento a lo anterior, el investigador empleará una base de datos con mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario que se me aplicará, con número de folio y código de barras, sin emplear mi nombre y de esta forma conservar mi anonimato.

Datos de los investigadores principales con los cuales usted puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio.

Usted puede contactar al Dr. Ricardo Juárez Ocaña al número telefónico 5141-5300 red 16555, al Dr. Jesús Moreno García al tel. 5141-5300 red 16635, al Dr. Francisco Javier Alvarado Gay al número telefónico 5141-5300 red 16558, responsables clínicos; con el Dr. Juan Antonio González Barrios asesor del proyecto al número telefónico 5141-5300 red 16605 o con la Dra. María del Rocío Thompson Bonilla responsable técnico del proyecto al número telefónico 51415300 en la extensión 16610, con horario de lunes a viernes de 8:00 a 14:00.

ISSSTE
HOSPITAL REGIONAL 1o. DE OCTUBRE

27 JUN, 2012

COMITÉ DE ÉTICA



ISSSTE "Identificación de Células Tumorales Circulantes, de Cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas, que acuden a donar sangre".
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

He leído y entendido toda la información contenida en este consentimiento informado. Todas mis dudas fueron resueltas a mi entera satisfacción por lo que acepto que una muestra de mi sangre, sea tomada para la realización del estudio molecular. Entiendo que recibiré una copia de este documento y que al firmar este consentimiento informado, no he renunciado a los derechos legales que tengo como derechohabiente, en caso de serlo, por lo que autorizo la recolección de una muestra de mi sangre para que sea incluida en este estudio.

Yo quiero donar una muestra de mi sangre.

Nombre:

Para que sea incluida en el estudio: "Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama, en mujeres clínicamente sanas que acuden a donar sangre"

Firme aquí Fecha de la firma

 Nombre del investigador

 Fecha de la firma

 Firma del investigador

 Nombre del Testigo 1 y parentesco

 Firma del Testigo 1

 Dirección del Testigo 1

 Fecha de la Firma

 Nombre del Testigo 2 y parentesco

 Firma del Testigo 2

 Dirección del Testigo 2

 Fecha de la Firma

ISSSTE
 HOSPITAL REGIONAL 1o. DE OCTUBRE

27 JUN. 2012

COMITÉ DE ÉTICA

2015

38/4

Apéndice **B**

Cartél para difusión del Proyecto



The poster features a red background with white and light pink text. At the top left is the ISSSTE logo, a stylized figure with arms raised. To its right is the text 'ISSSTE INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO'. Further right, in white text on a red background, is 'Hospital Regional "1° de Octubre" Laboratorio de Medicina Genómica Proyecto de Investigación Aplicada'. The main title is in pink: 'Identificación de células tumorales circulantes de cáncer de mama en mujeres clínicamente sanas que acuden a donar sangre'. Below this is a photograph of three women's shoulders and necks, with a pink ribbon symbol overlaid. The text 'Por un diagnóstico temprano del cáncer de mama' is in a dark red serif font, followed by 'Tú puedes ayudar donando un poco de tu sangre' in a smaller, italicized font. At the bottom, contact information is listed in white text on a dark red background. On the left side of the poster, there are two circular logos: the top one is the ISSSTE logo, and the bottom one is the logo of the Hospital Regional '1° de Octubre'.

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

Apéndice **C**

Artículo de Revisión

ARTÍCULO DE REVISIÓN
Rev Esp Méd Quir 2014;19:45-51.



Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo. Por esto, la investigación que se realiza día a día es extenuante. Sin embargo, aún falta mucho por esclarecer. Hoy por hoy se sabe que, desde estadios muy tempranos, un proceso neoplásico maligno puede desprender hacia la circulación sanguínea células con características similares a las del tumor (células tumorales circulantes, CTC) las cuales, cumpliendo algunas condiciones, pueden tener la capacidad para anclarse a casi cualquier tejido sano, diferente al de su sitio de origen, y así generar un nuevo crecimiento tumoral (metástasis). El objetivo de esta revisión es describir cómo se comportan estas células, así como su identificación, importancia clínica en el diagnóstico, pronóstico y como agentes de riesgo biológico en la terapia transfusional.

Palabras clave: CTC, cáncer de mama, diagnóstico molecular, hemotransfusión.

Esmeralda Morán Mendoza^{1&8}
Jorge Rodríguez Gallegos^{2&8}
Manuel Lara Lozano³
Celia Piña Leyva⁴
María del Rocío Thompson Bonilla⁵
Guillermina Rosas Sandoval⁶
Hayde Nallely Moreno Sandoval⁷
Gabina Calderón Rosete M⁸
Sergio Israel Rangel Guerrero⁹
José Luis Merino García¹⁰
Juan Antonio González Barrios¹¹

⁵⁻⁶⁻¹¹ Doctor en Ciencias

³⁻⁴⁻⁷⁻⁸ Maestro en Ciencias

¹⁰ Químico

^{1&2&9} Pasante de la carrera de Química

¹⁻² Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻¹⁰⁻¹¹ Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre.

⁷ Laboratorio de Virología, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

⁸ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.

⁹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

^{*} Los autores contribuyeron de igual forma para la realización de esta revisión.

Circulating tumor cells in breast cancer: a potential biological hazard

ABSTRACT

At the present time, cancer affects millions of persons worldwide. Due to this fact, research in this area is thorough. Nevertheless, there are many voids in knowledge. Today it is known that from early stages, a neoplastic process can deliver cells to the bloodstream that have similar characteristics to the tumor cells (Circulating Tumor Cells, CTCs). Given certain condition, these cells can anchor to almost any tissue different to the original and generate a new tumor growth (metastasis). The purpose of this revision is to describe the behavior, identification and clinical relevancy in diagnosis and prognosis of these cells, as well as a risk agent in transfusion therapy.

Keywords: CTCs, Breast cancer, Molecular diagnosis, Blood transfusion.

Recibido: octubre 2013

Aceptado: enero 2014

Correspondencia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Hospital Regional 1o de Octubre
Avenida IPN No. 1669
Colonia Magdalena de las Salinas
CP 07760, México, D.F.
Tel: 01 (55) 51415300 Ext. 16605
jantgonzalez@issste.gob.mx

Este artículo debe citarse como

Morán Mendoza E, Rodríguez Gallegos J, Lara Lozano M, Piña Leyva C, Thompson Bonilla MR, Rosas Sandoval G y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. Rev Esp Med Quir 2014;19:45-51.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento sin control y diseminación de un determinado tipo de células en prácticamente cualquier sitio del cuerpo: pulmón, estómago, hígado riñón, etc.¹

Específicamente, el cáncer de mama es un tumor maligno originado en los conductos o lobulillos (Figura 1).² A escala mundial se registran 411,000 muertes al año a causa de esta enfermedad y se estima que en los últimos 5 años 4.4 millones de mujeres han sido diagnosticadas con la enfermedad. La tasa de supervivencia del cáncer mamario varía mucho en todo el mundo, desde 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores a 40% en los países de ingresos bajos.³ A partir de 2006 el cáncer mamario ha sido la segunda causa de muerte general en mujeres de 30 a 50 años; y la primera por cáncer, desplazando al cáncer cérvico-uterino.²

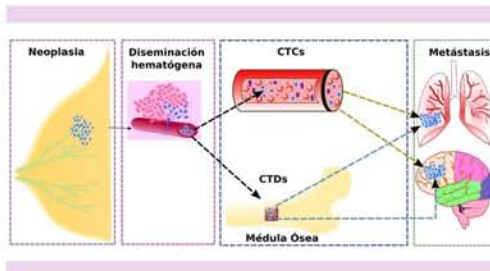


Figura 1. Historia natural del cáncer de mama. En su estadio incipiente se encuentra localizado en la mama; sin embargo, desde esta etapa se produce la diseminación hematológica de células tumorales que pueden tomar dos caminos. **A)** Células tumorales diseminantes (CTD) las cuales se alojan en la médula ósea y posteriormente se reproducen y diseminan a otros tejidos coaccionando metástasis. **B)** Células tumorales circulantes (CTC) que se desprenden del tumor primario y originan metástasis de forma directa. **C)** La metástasis es el resultado de la implantación de las CTD o CTC en el parénquima de un tejido específico.

A través de varios estudios se ha determinado que las células tumorales se desprenden del tumor primario en las etapas iniciales de la progresión maligna. De esta manera, las células liberadas invaden capilares viajando por el torrente sanguíneo; por ello se les conoce como células tumorales circulantes (CTC). Al adherirse a las paredes de los capilares y escapar del vaso sanguíneo (extravasación) pueden establecerse en otro órgano diferente al del tumor primario generando metástasis.⁴ Sin embargo, las CTC 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.⁵

Identificación de células tumorales circulantes

Las células tumorales circulantes (CTC) pueden distinguirse de las células normales en sangre periférica mediante sus características físicas y biológicas. Para ello se requieren de técnicas sensibles y específicas que permitan su correcta identificación dado que la concentración de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con un proceso metastásico en curso, no supera el índice de una CTC por cada 10^5 células leucocitarias; es por ello que la mayoría de los sistemas de detección consisten en una fase de enriquecimiento seguida del proceso de detección en sí mismo.⁶ Generalmente, podemos decir, que los sistemas de detección se categorizan en dos tipos:

1. Técnicas basadas en la identificación de ácidos nucleicos.
2. Separación de las células tumorales circulantes (citometría).⁷

Técnicas basadas en ácidos nucleicos: aunque la detección de alteraciones genéticas en ADN presente en la circulación sanguínea, tales como mutaciones en protooncogenes, genes supresores

Morán Mendoza E y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama



de tumor o ADN metilado aberrante, pueden emplearse como marcadores de ADN derivado del tumor primario; la detección de ADN asociado con el tumor en el plasma puede deberse simplemente a la presencia de ADN circulante, sin indicar necesariamente la presencia de CTC ya que el ADN libre tiene una vida media prolongada en el plasma y puede ser detectable mucho tiempo después de que fue liberado por un derrame en el tumor primario, haciendo que la detección de ADN en sangre pueda reflejar meramente la presencia de ADN libre y no de células tumorales circulantes. Otro inconveniente es que, debido a que los cambios como la metilación del ADN ocurren en los estadios tempranos del proceso de tumorigénesis, tales anomalías pueden ser detectadas en ADN liberado de lesiones displásicas de pacientes que no tienen lesiones neoplásicas. Así pues, aunque la posible detección de CTC basada en ADN es prometedora, aún tiene muchos retos que superar antes de poder ser usada en la práctica clínica.

Por otra parte, las técnicas de retrotranscripción y posterior amplificación de ADNc a partir de ARN permiten estimar indirectamente la presencia de CTC al evaluar la expresión de marcadores específicos de ARNm⁸ tales como CK19, MUC1, Mam-A y antígeno carinoembrionario. Estos marcadores, si se emplean en paneles, es decir, un sistema de evaluación de más de un marcador de manera simultánea, permiten elevar la especificidad de la técnica.⁸

En definitiva, las principales ventajas de la reacción en cadena de la polimerasa de marcadores basados en ARNm son su gran sensibilidad y la amplia gama de iniciadores disponibles aunadas a la posibilidad de emplear dichos marcadores no sólo para detectar CTC sino para hacer predicciones y pronósticos mediante el análisis de los marcadores expresados. Sin embargo, esta modalidad también tiene limitaciones, entre las cuales se incluyen:

1. La propia *inestabilidad del ARN* que hace necesaria la aplicación de medidas específicas durante los procesos de extracción, como son el almacenamiento y la preparación de la muestra.
2. El riesgo de *falsos negativos* debidos a que las CTC estén presentes pero no expresen los marcadores a estudiar.
3. *Falsos positivos* provocados por una sobreexpresión de marcadores en células normales, contaminación de la muestra o transcripción ilegítima de genes.

La técnica, al requerir la destrucción de las células hace imposible su caracterización morfológica.^{8,9} También existen ventajas, como por ejemplo; el uso de paneles con múltiples marcadores y la creación de nuevos y mejores oligonucleótidos disminuyen la cantidad de falsos positivos, mientras que los avances en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real permiten una mayor seguridad al diferenciar entre células cancerígenas y no cancerígenas, estableciendo qué valores de transcripción corresponden a las células tumorales.⁶

Métodos citométricos: incluyen una gran variedad de técnicas basadas en inmunohistoquímica, inmunofluorescencia *in situ* y citometría de flujo.⁹ Estos sistemas aíslan la célula completa permitiendo su caracterización morfológica y molecular.⁷ A continuación se mencionan algunos de los más utilizados.

1. *Sistema CellSearch:* se trata de un dispositivo automatizado de enriquecimiento y detección inmunocitoquímica desarrollado por la empresa Veridex (NJ, USA). El sistema de enriquecimiento usa partículas magnéticas marcadas con anticuerpos dirigidos a las moléculas de adhesión epitelial (EpCAM) que permite separar a aquellas células que expresen dichos antígenos. Después del enriquecimiento, las células capturadas

son enfrentadas con anticuerpos fluorescentes monoclonales contra leucocitos (CD45) y células epiteliales (citoqueratinas 8, 18 y 19), acto seguido, se generan fotografías de las muestras que pueden ser evaluadas por un analista capacitado.^{7,10} Las CTC se definen como células mononucleares con un perfil inmunológico CD45-/CK+.^{9,11} Este método está autorizado por la FDA para ser usado en la detección de CTC en pacientes diagnosticados con cáncer metastásico de mama, colon y próstata. La sensibilidad del método se encuentra en el orden de hasta una CTC por cada 7.5 mL de sangre periférica, este dato ha sido evaluado y confirmado en varios estudios realizados por distintas instituciones.⁹ El sistema también tiene sus desventajas, como el exceso de tiempo gastado para la revisión de las imágenes y la necesidad de personal bien capacitado destinado a realizar dichas revisiones. Además, en estudios recientes han reportado que el genotipo "normal" del cáncer de mama invasivo (que representa aproximadamente 10% de todos los casos) es típicamente negativo para la expresión de EpCAM y esto puede propiciar la aparición de falsos negativos en las determinaciones de CTC mediante el sistema CellSearch.¹²

2. *Ensayo de microfiltrado en membrana:* en este método se aprovecha la diferencia de tamaño entre las CTC y las células sanguíneas normales. Los filtros de policarbonato fueron los primeros en desarrollarse y son relativamente eficientes, baratos y sencillos de usar; recientemente se han logrado fabricar microfiltros a base de parileno C especializados en separar CTC. Después de la separación las células se someten a un proceso de reacción en cadena de la polimerasa directamente en la membrana de filtrado. Aun no se han reportado ensayos clínicos usando esta técnica y tampoco tiene fecha de salida al mercado.^{7,9}

3. *Adna Test:* la prueba Adna es otro sistema basado en enriquecimiento de CTC mediante el uso de perlas con recubrimiento magnético; sin embargo, a diferencia de CellSearch, el sistema usa

como blanco del sistema de captura una mezcla de antígenos de superficie en lugar de uno solo. Después del enriquecimiento inmunomagnético el sistema extrae el ARNm que será usado en una subsecuente reacción en cadena de la polimerasa para determinar de manera indirecta el número de CTC a través de la detección de 3 marcadores asociados: MUC1, HER2 y la glicoproteína de superficie GA733-2. Al combinar las técnicas tradicionales de anticuerpos con la reacción en cadena de la polimerasa se obtiene sensibilidad superior a la de CellSearch.^{7,9} Al día de hoy el sistema se comercializa en la Unión Europea para su uso en cáncer colorrectal y de mama, pero no ha obtenido la aprobación regulatoria de la FDA para su comercialización en Estados Unidos.

4. *CTC-chip:* es un método en el cual una placa de micropostes cubiertos con anticuerpos anti-EpCAM interacciona con una muestra de sangre periférica anticoagulada del paciente que se hace circular por la placa mediante un sistema de flujo laminar; se produce un área de contacto mayor que se refleja en una recolección de células EpCAM+ más eficiente. Las CTC capturadas son identificadas mediante microscopía de fluorescencia: positivas para citoqueratinas y negativas para el antígeno de superficie CD-45. La sensibilidad del CTC-chip es mucho mayor a la del sistema CellSearch debido a la mayor superficie de contacto disponible y al lento flujo de la muestra de sangre a través de la placa (1-2 mL de sangre por hora). Además, atrapa menos leucocitos obteniéndose rendimientos de CTC superiores a 50% de las células capturadas, en comparación con el 0.1% de los sistemas magnéticos.^{11,13} Este sistema aún no se encuentra disponible en el mercado pues todavía está en fase de desarrollo.^{6-8,14}

Además de los mencionados existen otros sistemas: *EPISPOT*, *FAST*, *Citometría de Escaneo Lasser* entre otros, los cuales aún están en desarrollo y sólo se emplean en investigación clínica y no se encuentran disponibles en el mercado.

Morán Mendoza E y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama



Valor diagnóstico

Las células tumorales circulantes (CTC) son uno de los principales biomarcadores para el diagnóstico y la terapia en el cáncer sistémico. Sin embargo, la tecnología para su detección aún se encuentra en fase de validación, especialmente en el cáncer no metastásico, hecho que en la actualidad impide el uso clínico de las CTC como marcadores diagnósticos. A la fecha solamente se ha aprovechado su poder predictivo para la evolución del tratamiento y las recidivas. Recientemente, en el 2013, se determinó que el análisis de las células mononucleares obtenidas por leucoféresis (LA) de sangre periférica permite el enriquecimiento de CTC pues estas últimas tienen una densidad similar a los mononucleares y por lo general involucra el procesamiento de toda la sangre circulante de un individuo. Con esta aproximación se han podido detectar CTC en más de 90% de los pacientes con cáncer de mama no metastásico, obteniendo aproximadamente 100,000 CTC, con una media de 7.500 CTC por paciente, determinándose una correlación positiva entre el número de CTC con la propagación anatómica de la enfermedad. Se ha propuesto que la aféresis se puede combinar fácilmente con el sistema CellSearch aprobado por la FDA de Estados Unidos para la cuantificación de las CTC. La comparación directa entre la cuantificación de CTC a partir de 7.5 mL de sangre total reveló un mayor poder de resolución de la aféresis combinada con la inmunodetección por CellSearch para la evaluación pronóstica de pacientes con cáncer de mama no metastásico.

Se han hecho múltiples aproximaciones diagnósticas de CTC en diferentes tipos de cáncer y la identificación de ARNm que transcribe para los genes mucina-1, citoqueratina 19, HER2 y mamaglobina A; estos son los mejores biomarcadores de CTC en pacientes con cáncer de mama y tienen su principal aplicación en la evaluación del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. Así, la mamaglobina tuvo con una sensibilidad

de 80% y una especificidad de 100% mientras que la mucina-1 tuvo una sensibilidad de 86% y una especificidad de 100%.¹⁵

En estudios previos se ha demostrado que en la etapa 1 de ciertos tipos de cáncer se pueden detectar CTC. Con base en éstos se realizó un estudio en el cual se detectó que 19.3% (n = 88 pacientes) con cáncer pulmonar en etapa I presentaban CTC y en 2 de los 17 pacientes positivos a CTC se evidenció metástasis.¹⁶

Valor pronóstico

Un estudio prospectivo para evaluar la importancia pronóstica de la detección de CTC en pacientes con cáncer de mama avanzado incluyó 80 pacientes con los siguientes criterios: mujeres con diagnóstico histológico de cáncer de mama, con evidencia de enfermedad metastásica mediante estudios de imagen, empezando una nueva línea de tratamiento o tratamiento para la enfermedad avanzada, con un máximo de dos líneas de tratamiento. Al inicio del estudio se reportaron 49 pacientes que tenía ≥ 5 CTC en 7.5 mL de sangre total. El número de referencia de CTC se asoció con la supervivencia libre de progresión (HR 2.5, intervalo de confianza del 95%: 1.2 a 5.4). En la última extracción de sangre las pacientes con aumento o CTC persistentemente ≥ 5 demostraron mayor riesgo estadístico significativo de progresión que las pacientes con CTC < 5 (HR 6.4, IC 95%: 2.8 a 14.6).¹⁷

Diversos estudios han permitido estimar que las CTC se encuentran en 70-100% de los pacientes con metástasis, así como en 46-71% de pacientes con afectación local. Además, se ha observado que en estadios tempranos de cáncer pueden encontrarse, en promedio, 16 CTC en 20 mL de sangre.¹⁸

En un estudio para evaluar el valor pronóstico de las CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico recién diagnosticado se demostró

que 30.3% (n = 59) de las pacientes con enfermedad metastásica *de novo* y 69.7% (n = 129) que presentaron reincidencia de cáncer de mama, así como 61.6% (n = 114) de las pacientes tenían una concentración de CTC < 5 y 38.4% (n = 71) de las que tenían una concentración de CTC ≥ 5 (Figura 2). La mediana de supervivencia global fue de 28.3 meses en las pacientes que tuvieron < 5 CTC por cada 7.5 mL de sangre total y de 15 meses en pacientes con ≥ 5 CTC por cada 7.5 mL de sangre total ($p < 0.0001$). Hecho que es independiente de la expresión del receptor HER-2/neu. Se reportó una supervivencia superior entre los pacientes con CTC < 5 si el paciente tenía reincidencia o si la enfermedad metastásica era *de novo*. Los pacientes con CTC ≥ 5 tenían una relación de riesgo de muerte de 3.64 (IC 95%: 2.11-6.30) en comparación con los pacientes con < 5 CTC (modelo multivariado).¹⁹

Comentario (riesgo biológico)

En reportes previos se ha demostrado que las CTC se encuentran presentes en pacientes con estadios 1 de cáncer de mama; sin embargo,

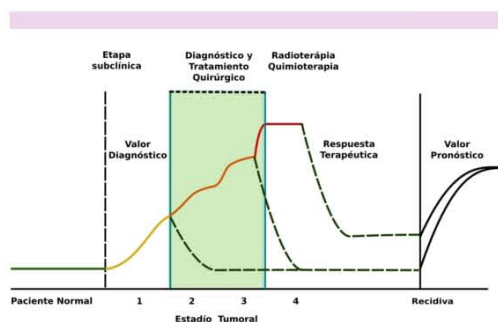


Figura 2. Curso temporal de las células tumorales circulantes y su valor clínico. Evolución natural de las CTC desde los estadios tempranos del cáncer de mama hasta estadios tardíos. En los países en vías de desarrollo el diagnóstico del cáncer de mama se realiza en estadios 2 y 3 que se caracterizan por alta concentración tanto de células tumorales circulantes como de células tumorales diseminantes.

alrededor del mundo la gran mayoría del diagnóstico temprano de esta enfermedad se realizó en estadios 2 o 3, por lo que las pacientes no diagnosticadas que se encuentran en etapa subclínica pudiesen ser admitidas por los servicios de banco de sangre como donadoras clínicamente sanas y las CTC presentes en los concentrados globulares provenientes de éstas pacientes podrían estar siendo transferidas a pacientes sanos, tanto hombres como mujeres. Aunado a esto, la realización de pruebas cruzadas asegura que estas CTC tengan un nicho adecuado para su desarrollo y pueden ser un factor condicionante y desencadenante de cáncer metastásico de origen desconocido. La estabilidad y viabilidad de las CTC en los concentrados globulares sin desleucocitar depende de las condiciones de almacenamiento y del tiempo que transcurre entre la extracción, separación y trasfusión de los paquetes globulares.²⁰ Quizá en esta parte habría que agregar porqué las pruebas cruzadas garantizan, lo que se propone en el texto, fundamentándolo en la base de la técnica, es decir, qué son las pruebas cruzadas.

DISCUSIÓN

La cuantificación de las CTC ha demostrado su utilidad como valor pronóstico, como marcador de la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. El futuro del diagnóstico de CTC es el análisis molecular, aunque aún se encuentra en desarrollo y depende de ensayos de aislamiento y purificación que generen mayores cantidades de CTC y, por lo tanto, una mayor cantidad del ADN tumoral, ARN mensajero tumoral y micro-ARN tumoral que faciliten la realización de técnicas de biología molecular encaminadas al diagnóstico e identificación de las CTC, que las discriminen de las células leucocitarias contaminantes.

En estudios previos se ha demostrado que las proteínas de enriquecimiento inmunomagnético

Morán Mendoza E y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama



utilizadas en las pruebas de detección de CTC (CellSearch), basada en la expresión de EpCAM, arrojan falsos negativos ya que ésta no se expresa en todos los subtipos de cáncer de mama.²¹ Sin embargo, al utilizar la proteína CD146 se aumenta la sensibilidad para la detección de CTC negativas a EpCAM.²² Este hecho es común a una gran cantidad de tumores cancerígenos, por lo que se hace indispensable contar con un conjunto específico de biomarcadores que identifiquen a cada tipo de cáncer.

En el futuro la correcta purificación y aislamiento de las CTC permitirá desarrollar los tratamientos anti-microARNs y tenerlos disponibles para su uso terapéutico en el cáncer de mama. Es muy probable que algunos de estos microARNs tumorales sean detectables en la circulación, lo cual podría simplificar y establecer las pruebas de fármacos encaminados a suprimir o a activar la maquinaria mirnómica con finalidad farmacoterapéutica.

REFERENCIAS

1. OMS | Cáncer [Internet]. WHO. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
2. Knaul F, López-Carillo L, et al. México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia. Informe final. Primera edición. México, DF: Fundación Mexicana para la Salud; 2009.
3. OMS | Cáncer de mama: prevención y control [Internet]. WHO. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index.html>
4. Circulating Tumor Cells for Cancer Diagnosis and Prognosis - Circulating Tumor Cells for Cancer Diagnosis and Prognosis. Disponible en: <http://cancer.scripps.edu/research.aspx>
5. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the "seed and soil" theory of metastatic dissemination. *Clin ExperMed*. 2006;6:145-9.
6. Graves H, Czerniecki BJ. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: An Evolving Role in Patient Prognosis and Disease Progression. *Pathology Research International*, 2011.
7. Kim SI, Jung H. Circulating Tumor Cells: Detection Methods and Potential Clinical Application in Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer* 2010;13:125.
8. Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008;14:5013-21.
9. Ross JS, Slodkowska EA. Circulating and Disseminated Tumor Cells in the Management of Breast Cancer. *AJCP* 2009;132:237-45.
10. Hou J-M, Krebs M, Ward T, Morris K, Sloane R, Blackhall F, et al. Circulating Tumor Cells, Enumeration and Beyond. *Cancers* 2010;2:1236-50.
11. How does the CELLSEARCH® CTC Test work? Disponible en: <https://www.cellsearchctc.com/about-cellsearch/how-cellsearch-ctc-test-works>
12. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:61-66.
13. Clinical Studies. Disponible en: http://www.adnagen.com/cfscrips/main_technology_clinical_studies.cfm?auswahl=01.25.20
14. Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating Tumor Cells: Evolving Evidence and Future Challenges. *The Oncologist* 2009;14:1070-82.
15. Ebeed SA, El-Moneim A, A N, Saad A, Zaher ER, Yassin OG, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in female breast cancer patients. *Alexandria Journal of Medicine* 2012;48:197-206.
16. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, et al. Circulating Tumor Cell as a Diagnostic Marker in Primary Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6980-6.
17. Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* 2008;19:891-7.
18. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NCR, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007;107:145-54.
19. Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008;113:2422-30.
20. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-8.
21. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, Spoel P van der, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Antibodies and the Detection of Circulating Normal-Like Breast Tumor Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2009;101:61-6.
22. Ren C, Han C, Wang D, Zhao X, Jin G, Shen H. Detection of circulating tumor cells: Clinical relevance of a novel metastatic tumor marker. *Exp Ther Med* 2011;2:385-91.

Apéndice **D**

Protocolos de trabajo

D.1. Protocolo de extracción de RNA de células nucleadas

Protocolo Ficoll-Paque completo								
Reactivos	Muestras							
	--	--	--	--	--	--	--	--
Ficoll-Paque (tubo Falcon)	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml
Agregar concentrado leucocitario. (Cuidado de no mezclar con el Ficoll)	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml
Centrifugar a 3500 rpm por 30 min. OJO: sin frenado (+10 min) Obtener la porción de ficol y de leucocitos (2a y tercera capa) en ependorfs Centrifugar a 14,000 rpm (maxima) por 10 min a 4°C (puede ser a °T normal) Decantar y homogeneizar								

Extracción del RNA total								
								miércoles, junio 01, 2016
Trabajar siempre en hielo								
Reactivos	Muestras							
	--	--	--	--	--	--	--	--
Trizol	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Descongelar si es necesario Homogeneizar hasta dilución Incubación 5 min T° amb.								
Reactivos	Muestras							
	--	--	--	--	--	--	--	--
Cloroformo	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL
Agitar vigorosamente durante 15 segundos (crucial para la compactación de proteínas) Incubar durante 5 minutos a TA Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C Separa la fase acuosa								
Reactivos	Muestras							
	--	--	--	--	--	--	--	--
Isopropanol	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL
Mezclar por inversión Incubar durante 10 min a TA Centrifugar a 12,000 rpm, durante 10min a 4°C Decantar el sobrenadante								
Reactivos	Muestras							
	--	--	--	--	--	--	--	--
Etanol al 75%	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
En caso de haber mas de un tubo contenedor, recolectar todas las pastillas de la misma muestra Lavar la pastilla con un solo golpe de vortex Centrifugar a 7,500 revoluciones por 5min a 4°C Decantar el sobrenadante y dejar secar al aire durante 5min, marcar el área Resuspender la pastilla de RNA total en 20-50µL de H ₂ O GBM (por pipeteo 200µL) * Si no se va a cuantificar, guardar el RNA a -80°C								
Cuantificación del RNA total Diluir 1µL del RNA total en 9 µL de H ₂ O GBM Leer la absorbancia (DO) a 260, 280 y 320nm [RNA total]=(DO*40*FD)/1000								
Verificación de la integridad del RNA total Preparar un gel de agarosa al 1% Cargar 8µL de la dilución 1:10 del RNA total con 2 µL de Buffer de carga Correr la electroforesis a 80 Volts por 45min Fotodocumentar la imagen y guardarla en en formato jpg o tiff								

D.2. Protocolo de Retrotranscripción

RTCAMA P20		Fecha	
Buffer de reacción 10X	DNasa 1	Adición de EDTA 25 mM	Adición de Oligo dT (0.5 µg/µl)
1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Preparar la siguiente mezcla de reacción			
		7 µL	
		Mezcla para hibridización	
		SuperScript III RT (200 U)	
		RNasa H	
		1 µL	
		1 µL	
Mezclar suavemente, incubar 5 minutos a 42 oC			
Mezclar / incubar 50 minutos a 55 oC/ Incubar 15 minutos a 70 oC Centrifugar con un push			
Incubar 20 minutos a 37 oC y finalizar la reacción incubando a 4 °C α			

Mezcla para hibridización		Reacciones	
Reactivos	1	x	
PCR buffer 10X	2	#i VALOR!	
MgCl2 50 mM	1	#i VALOR!	
dNTP mix 10mM	1	#i VALOR!	
DTT 0.1 M	2	#i VALOR!	
H2O inyectable	1	#i VALOR!	
Total	7	#i VALOR!	

Incubar 15 minutos a TA	Incubar 15 minutos a 65 oC/ Incubar 1 minuto en hielo / Push	Incubar 10 minutos a 70 oC/ Incubar 1 minuto en hielo / Push
-------------------------	--	--

D.3. Protocolo de PCR en Tiempo Real para β -actina

PCR para el gen constitutivo β actina

CaMa RT 16 diluido 1:5

Preparar la siguientes mezcla de reacción

Reactivos	1 Rx	4 Rx	
H ₂ O	18	72	18
Buffer del PCR 10X	2.5	10	2.5
MgCl ₂ 50mM	0.75	3	0.75
dNTP mix 10mM	0.5	2	0.5
Oligo F (10 μ M)	0.5	2	0.5
Oligo R (10 μ M)	0.5	2	0.5
<i>Taq Platinum</i>	0.25	1	0.25
cDNA	2		
Vol Total	25	92	23

Adicionar 23 μ L en cada tubo de reacción y 2 μ L de cDNA

Tamaño esperado ~250 pb

Protocolo de termociclado

Ciclo	Proceso	T°	Tiempo
1	Desnat	94	5 min
35	Desnat	94	30 seg
	Alin	55	30 seg
	Ext	72	13 seg
1	Ext final	72	5 min
	Mantenimiento	4	inf

D.4. Protocolo de PCR en tiempo real para el panel de detección de CTCs

Protocolo para qPCR con Kit EXPRESS qPCR Supermix Universal (invitrogen)

22/04/15

PLACA 11

Preparar la siguiente Mezcla de reacción (suficiente para el número de reacciones programadas +1 de cada sonda)

Reactivo	Rx GAPDH		Rx HER2		Rx KRT17		Rx Mam-A	
	1	100	1	100	1	100	1	100
qPCR MasterMix 2x	2.50	250.00	2.50	250.0	2.50	250.0	2.50	250.0
Fluorescent primer (Sonda)	0.25	25.00	0.25	25.00	0.25	25.00	0.25	25.00
Agua GBM cbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Vol. MIX (µL)	2.75	275.00	2.75	275.00	2.75	275.00	2.75	275.00
Vol. cDNA	2.50	250.0	2.5	250.00	2.50	250.00	2.50	250.00
Vol. Final	5.25	525.00	5.25	525.00	5.25	525.00	5.25	525.00

Sondas a usar:

Gen	Assay	Fluoroforo
GAPDH	Hs99999903_m1	FAM
HER2	Hs00170433_m1	FAM
KRT17	Hs01588578_m1	FAM
MAMA	Hs00935948_m1	FAM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
B	H2O	H2O	1212	1212	1220	1220	1228	1228	1236	1236	1244	1244	1252	1252	1260	1260	1186	1186	1479	1479	1487	1487	1499	1499
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
C	H2O	H2O	1212	1212	1220	1220	1228	1228	1236	1236	1244	1244	1252	1252	1260	1260	1186	1186	1479	1479	1487	1487	1499	1499
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
D	1205	1205	1213	1213	1221	1221	1229	1229	1237	1237	1245	1245	1253	1253	1261	1261	1470	1470	1480	1480	1489	1489	1500	1500
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
E	1205	1205	1213	1213	1221	1221	1229	1229	1237	1237	1245	1245	1253	1253	1261	1261	1470	1470	1480	1480	1489	1489	1500	1500
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
F	1206	1206	1214	1214	1222	1222	1230	1230	1238	1238	1246	1246	1254	1254	1262	1262	1471	1471	1481	1481	1491	1491	1501	1501
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
G	1206	1206	1214	1214	1222	1222	1230	1230	1238	1238	1246	1246	1254	1254	1262	1262	1471	1471	1481	1481	1491	1491	1501	1501
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
H	1207	1207	1215	1215	1223	1223	1231	1231	1239	1239	1247	1247	1255	1255	1263	1263	1473	1473	1482	1482	1492	1492	1503	1503
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
I	1207	1207	1215	1215	1223	1223	1231	1231	1239	1239	1247	1247	1255	1255	1263	1263	1473	1473	1482	1482	1492	1492	1503	1503
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
J	1208	1208	1216	1216	1224	1224	1232	1232	1240	1240	1248	1248	1256	1256	1265	1265	1475	1475	1483	1483	1494	1494	1504	1504
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
K	1208	1208	1216	1216	1224	1224	1232	1232	1240	1240	1248	1248	1256	1256	1265	1265	1475	1475	1483	1483	1494	1494	1504	1504
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
L	1209	1209	1217	1217	1225	1225	1233	1233	1241	1241	1249	1249	1257	1257	1266	1266	1476	1476	1484	1484	1495	1495	1505	1505
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
M	1209	1209	1217	1217	1225	1225	1233	1233	1241	1241	1249	1249	1257	1257	1266	1266	1476	1476	1484	1484	1495	1495	1505	1505
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
N	1210	1210	1218	1218	1226	1226	1234	1234	1242	1242	1250	1250	1258	1258	1267	1267	1477	1477	1485	1485	1496	1496	1474	1474
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
O	1210	1210	1218	1218	1226	1226	1234	1234	1242	1242	1250	1250	1258	1258	1267	1267	1477	1477	1485	1485	1496	1496	1474	1474
	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2	GAPDH	HER2
P	1211	1211	1219	1219	1227	1227	1235	1235	1243	1243	1251	1251	1259	1259	1268	1268	1478	1478	1486	1486	1498	1498	C+	C+
	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A	KRT17	SEC-A
	1211	1211	1219	1219	1227	1227	1235	1235	1243	1243	1251	1251	1259	1259	1268	1268	1478	1478	1486	1486	1498	1498	C+	C+

Programa de ciclado en equipo 7900HT:

Cubrir la placa con film óptico y dar un Push

Ciclos	Tiempo	t (°C)
1	10min	37
45	10min	95
	10seg	95
	1min	60

