



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UMAE HOSPITAL DE GINECOOBSTETRICIA NO.4  
LUIS CASTELAZO AYALA

**Expresión proteica de BIK, GRP78 y BECN1 como marcadores de pronóstico en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado**

**TESIS**

que para optar por el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA

**María Teresa de Jesús Cervantes Díaz**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Eunice López Muñoz

Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional SXXI.  
UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4, Luis Castelazo Ayala, Unidad de  
Investigación Médica en Medicina Reproductiva.

COMITÉ TUTORAL

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez

Instituto Mexicano del Seguro Social, Responsable de la entidad académica Centro  
Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni

Instituto Nacional de Medicina Genómica, Subdirección de Genómica Computacional

Dra. Patricia Piña Sánchez

Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional SXXI.  
UMAE Hospital de Oncología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades  
Oncológicas.

Ciudad de México, Noviembre 2016



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.

## DEDICATORIAS

A mis abuelitos Armando † y Teté †, por haber dejado en mí un ejemplo de superación, integridad y amor que siempre estarán en mi memoria.

A mis papás Luis Felipe y María Teresa, por haberme dado las bases para salir adelante en esta vida y por enseñarme con su ejemplo, que todo lo que me proponga es posible lograrlo, con esfuerzo y dedicación.

A Julián, por darme su amor y apoyo en cada momento decisivo de mi carrera y de la vida, y por impulsarme a alcanzar mis sueños.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis tíos Armando, Ligia y Felipe por estar pendientes de mí y de cada uno de los pasos de mi carrera, a pesar de la distancia.*

*A Coral, Aurea, Alan, Dr. Huicochea, Dra. Araujo, por apoyarme desde que decidí hacer la Maestría y por alentarme durante estos dos años.*

*A Jorge, José Carlos, Ángel, Fernando, Gabriel, Herbert, Horacio y Luis por su amistad a pesar de la distancia, y por ser como mis hermanos.*

*A Laura y María Eugenia por su amistad incondicional, por estar en las buenas y en las malas a pesar de la distancia, y por ser como mis hermanas.*

*A Grethel y María José por su amistad y apoyo incondicionales.*

*A la Dra. Eunice López Muñoz, por su apoyo durante toda la Maestría, por permitirme colaborar en su línea de investigación y por sus enseñanzas.*

*Al Dr. Diego Arenas Aranda †, por haberme animado a iniciar la Maestría y por sus enseñanzas.*

*Al Dr. Fabio Salamanca Gómez, por su apoyo y colaboración en este proyecto y durante la Maestría.*

*A todos los pacientes, médicos, enfermeras, profesores e investigadores que han colaborado incondicionalmente en mi formación humana y profesional.*

### **Lugar de realización del proyecto**

- Servicio de Ginecología Oncológica y Departamento de Patología, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Servicio de Ginecología Oncológica y Departamento de Patología, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia No. 3 Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez, Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Laboratorio de Oncología Molecular, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social.

**El presente trabajo fue apoyado por:**

El FIS-IMSS a través del proyecto titulado: “*Expresión proteica de BIK, BECN1, PTK6 y GRP78 como marcadores de pronóstico en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado*”, con el número de financiamiento FIS/IMSS/PROT/G13/1230.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....	7
I. RESUMEN .....	8
II. MARCO TEÓRICO .....	11
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA .....	11
CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO .....	12
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO .....	16
BIOMARCADORES EN CÁNCER DE MAMA .....	18
BIK (BCL-2 INTERACTING KILLER) .....	22
GRP78 (GLUCOSE-RELATED PROTEIN, 78 KDA) .....	23
BECN1 (BECLIN-1) .....	26
TÉCNICAS EMPLEADAS PARA BÚSQUDA DE POTENCIALES BIOMARCADORES .....	27
INMUNOHISTOQUÍMICA EN MICROARREGLOS DE TEJIDO .....	27
JUSTIFICACIÓN .....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	31
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	32
HIPÓTESIS .....	33
OBJETIVOS .....	34
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	35
CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	35
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	35
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	35
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	35
VARIABLES DE ESTUDIO .....	36
CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA .....	43
ALGORITMO DE PROCEDIMIENTOS .....	43
SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO .....	44
CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLOS DE TEJIDO .....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
ASPECTOS ÉTICOS .....	47
IV. RESULTADOS .....	48
V. DISCUSIÓN .....	64
VI. CONCLUSIONES .....	68
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
VIII. ANEXOS .....	77
ANEXO 1. ESTADIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA .....	77
ANEXO 2. SISTEMA SCARF-BLOOM-RICHARDSON MODIFICADO PARA DETERMINAR GRADO HISTOLÓGICO .....	80
ANEXO 3. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	81
ANEXO 4. CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLOS DE TEJIDO Y PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA .....	82

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### Tablas

Tabla 1. Variables de estudio.....	40
Tabla 2. Microarreglos de tejido construidos y número de muestras.....	49
Tablas 3-8. Microarreglos de tejido y distribución de muestras.....	51
Tabla 9. Anticuerpos, concentración del anticuerpo y dilución de trabajo.....	52
Tabla 10. Diluciones durante el proceso de estandarización y pretratamiento utilizado.....	52

### Figuras

Figura 1. Tipo histológico de cáncer de mama.....	48
Figura 2. Imágenes de inmunohistoquímica de GRP78, BECN1 y BIK (400x).....	53
Figura 3. Supervivencia a 3 años en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado en relación al tamaño tumoral.....	54
Figura 4. Supervivencia a 3 años en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado en relación al número de ganglios metastásicos.....	55
Figura 5. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años, respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de los ER $\alpha$ .....	56
Figura 6. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años, respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de los PR.....	57
Figura 7. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años, respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de HER2/NEU.....	58
Figura 8. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años en relación a la intensidad de tinción de BECN1.....	59
Figura 9. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la respuesta clínica completa a 3 años en relación a la expresión de BIK y ER $\alpha$ citoplásmico.....	60
Figura 10. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la respuesta patológica completa a 3 años en relación a la expresión de BIK.....	61
Figura 11. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la recidiva local y sistémica a 3 años (36 meses) en relación a BECN1 y GRP78.....	62
Figura 12. Construcción de un microarreglo de tejido.....	81
Figura 13. Sistema de detección UltraView Dab Universal.....	83



## I. RESUMEN

### “Expresión proteica de BIK, GRP78 y BECN1 como marcadores de pronóstico en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado”

**Introducción.** El cáncer de mama es un problema de salud pública global por el aumento en su incidencia y tasas de mortalidad. En México, un gran porcentaje de las pacientes con cáncer de mama se diagnostican en estadios localmente avanzado y sistémicos; la quimioterapia neoadyuvante y la cirugía son las opciones actuales para el manejo de este grupo de pacientes. La evaluación de la respuesta clínica, respuesta patológica y supervivencia global constituyen aspectos trascendentales en el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado, además de constituir una plataforma excelente para la medicina traslacional, en donde nuevos biomarcadores pueden ser evaluados en cuanto a su valor pronóstico. Existe evidencia de la asociación de la sobreexpresión de GRP78 con resistencia a quimioterapéuticos y menor periodo libre de enfermedad, de la baja expresión de BECN1 a nivel de mRNA con mal pronóstico y recientemente, de la sobreexpresión de BIK con menor periodo libre de enfermedad y menor supervivencia global en cáncer de mama.

**Objetivo.** Evaluar la asociación de la expresión proteica de BIK, GRP78 y BECN1 con respuesta clínica, patológica y supervivencia a 3 años en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado.

**Material y métodos.** Estudio observacional, analítico, retrospectivo. Se incluyeron 109 biopsias de tejido mamario embebidas en parafina, obtenidas previo a recibir tratamiento, de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado. Se construyeron microarreglos de tejido con biopsias de tejido tumoral embebido en parafina, en los que se realizó análisis inmunohistoquímico automatizado para ER $\alpha$ , PR, HER2, ER $\beta$ , BIK, GRP78 y BECN1. Se utilizaron anticuerpos VENTANA Breast Markers (*Ventana Medical Systems, Inc. Tucson,*

Arizona, USA) para ER $\alpha$ , PR y HER2, y anticuerpos específicos abcam (abcam plc, UK) para ER $\beta$ , BIK, GRP78 y BECN1. La expresión de ER $\alpha$ , PR y HER2 se evaluó de acuerdo a los criterios de la ASCO (American Society of Clinical Oncology), mientras que las otras proteínas se evaluaron por intensidad de la tinción (1: débil; 2: moderada; 3: intensa) y porcentaje de células teñidas (1: 0 a <10%; 2: 10 a <50%; 3: 50-100%). La evaluación total fue positiva cuando ambas puntuaciones fueron  $\geq 2$ . La asociación entre BIK, GRP78, BECN1 y respuesta clínica, respuesta patológica y supervivencia a 3 años fueron evaluados mediante análisis de Kaplan-Meier.

**Resultados.** El promedio de edad en las 109 pacientes fue de  $57.3 \pm 13.1$  años. Recibieron QT neoadyuvante 63/109 pacientes (57.7%). Se observó respuesta patológica parcial en 61.2% y completa en 19.3%. HER2 se encontró positivo en 14 (15.5%) tumores, ER $\alpha$  en 63.3% y PR en 48.3%. ER $\beta$  nuclear fue positivo en 44.2% de las muestras y ER $\beta$  citoplásmico en 67.4%. BIK se expresó en 80.8% de las muestras, GRP78 en 76.7% y BECN1 en 60.7%. La supervivencia global a 3 años fue del 69.7%. La tinción intensa de BECN1 se asoció con menor supervivencia ( $p=0.020$ ). Se encontró un mayor porcentaje de respuesta clínica completa y patológica en quienes expresaban BIK en el tejido tumoral comparado con quienes no lo expresaban ( $p=0.029$  y  $p=0.005$ , respectivamente); también se encontró un mayor porcentaje de respuesta clínica completa en aquellas muestras de tejido tumoral con tinción citoplásmica intensa de ER $\beta$  ( $p=0.018$ ). La tinción intensa de BECN1 se asoció con recidiva local y sistémica ( $p=0.006$  y  $p=0.044$ , respectivamente); la expresión de GRP78 sólo se asoció con recidiva local ( $p=0.024$ ).

**Conclusiones:** La expresión diferencial en muestras de tejido neoplásico de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado de las proteínas propuestas tiene valor pronóstico con potencial utilidad clínica. En nuestro estudio observamos que en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado, la expresión de BECN1 se asocia con una peor supervivencia global, y

recidiva tanto local como sistémica. Tanto la expresión de BIK como la de ER $\beta$  citoplásmico se asocian con mayor frecuencia de respuesta clínica completa; mientras que sólo la expresión de BIK se asocia con mayor respuesta patológica. La expresión de GRP78 se asocia con mayor frecuencia de recidiva local y probablemente con resistencia a tratamiento.

## II. MARCO TEÓRICO

### **Epidemiología del cáncer de mama**

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial ya que se ha presentado un incremento en su incidencia y en las tasas de mortalidad. De acuerdo a las estadísticas de GLOBOCAN 2012 (Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012) el cáncer de mama es el tumor maligno que se diagnostica con más frecuencia en el mundo y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, estimando que se diagnostican 1.7 millones de casos nuevos y mueren 521,900 mujeres cada año por esta causa. Por sí solo, el cáncer de mama representa el 25% del total de cánceres diagnosticados en mujeres a nivel mundial y el 15% del total de muertes por cáncer en mujeres (1,2).

Su tasa de incidencia varía de una región geográfica a otra, siendo de 19.3 por cada 100,000 mujeres en el este de África a 89.7 por cada 100,000 mujeres en el oeste de Europa. Se ha observado que las tasas de incidencia son más altas (mayores a 80 por cada 100,000 mujeres) en países desarrollados (excepto Japón) y bajas en la mayoría de los países no desarrollados (menores a 40 por cada 100,000 mujeres). El rango de tasas de mortalidad es mucho menor, aproximadamente de 6 a 19 por cada 100,000 mujeres, debido a las tasas de sobrevivencia más favorables en países desarrollados, a pesar de tener las incidencias más altas (2).

En Estados Unidos de Norteamérica actualmente se calculan 246,660 casos nuevos por año (29% de los casos de cáncer) y 40,450 muertes por año (14% de las muertes por cáncer) en mujeres (3).

En México, su incidencia ha ido en aumento, de 21.4 por cada 100,000 mujeres en el 2007 a 28.7 por cada 100,000 mujeres de 20 años y mayores en el año 2014. Para el 2013, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en mujeres de 20 años y más (29.5%) y la segunda causa de mortalidad (14.8%) (4).

Debido a que las tasas de supervivencia y mortalidad son influidas directamente por el estadio clínico al momento del diagnóstico (5,6), se han tratado de implementar programas para la detección temprana del cáncer de mama, tales como la auto-exploración y el tamizaje por estudio mamográfico, sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, en nuestro país es frecuente detectar cáncer de mama en estadios localmente avanzados o sistémicos (7).

### **Cáncer de mama localmente avanzado**

El cáncer de mama localmente avanzado, incluye a las pacientes con una significativa afectación del volumen mamario, con un tumor de tamaño variable (tumores que usualmente miden más de 5 cm), asociado a edema, que infiltra la piel, ulcerándola o no y que infiltra los ganglios linfáticos regionales (8).

Existe evidencia de la gran heterogeneidad en este grupo de tumores, ya que puede incluir tumores de gran tamaño con infiltración local, sin agresividad sistémica y sin afectación ganglionar, o bien, tumores pequeños de crecimiento rápido y escasa afectación local, pero con grave diseminación hacia los ganglios linfáticos. Dada la heterogeneidad antes descrita, la mejor clasificación de estos tumores para su estudio adecuado e interpretación de los resultados, es la de estadios clínicos (9,10). De acuerdo con el sistema de estadificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* (11) (*Anexo 1*) el cáncer de mama localmente avanzado se define como enfermedad de etapa III y es representada por el estadio IIIA (T0N2M0; T1/2N2M0; T3N1/2M0), estadio IIIB (T4N0–2M0) y estadio IIIC (TcualquieraN3M0). Entre estas formas de cáncer de mama localmente avanzado, los pacientes en estadio IIIA (T3N1M0) se considera que tienen cáncer de mama quirúrgicamente resecable, mientras que las otras formas se consideran inoperables (12). En algunos casos, la definición de cáncer de mama localmente avanzado se amplía para incluir pacientes con estadio clínico IIB, con tumor primario  $\geq 5$  cm y sin involucro de ganglios linfáticos (T3 N0) (13), sin embargo, la mayoría de los expertos consideran que las pacientes con estadios IIB–IIIA (T3 N0–1) tienen tumores de

mama grandes operables, en contraste con los casos verdaderamente no operables con inflamación y/o involucro extenso de la piel, ganglios linfáticos fijos o muy voluminosos y/o involucro de ganglios linfáticos supraclaviculares o mamaros internos (14).

El carcinoma de mama inflamatorio es un subtipo único de cáncer de mama localmente avanzado (8.5% de los casos), con un curso clinicopatológico distintivo. Se caracteriza por un tiempo de progresión rápido, con una alta probabilidad de metástasis regionales y a distancia al momento del diagnóstico y pobre pronóstico a pesar de tratamiento múltiple agresivo. Su diagnóstico es clínico y está basado en algunos hallazgos como dolor, edema, eritema y un crecimiento rápido de la mama, acompañado de 'piel de naranja'. En la mayoría de los casos estos signos no se acompañan por una masa palpable, llevando a retraso en el diagnóstico. Evidencia reciente sugiere que este tipo de cáncer de mama representa una entidad distinta comparada con otras formas de cáncer de mama localmente avanzado (13,14).

La prevalencia del cáncer de mama localmente avanzado es muy variable y depende del lugar, nivel cultural y social; por ejemplo, en países desarrollados donde el tamizaje es mayor, se registra solo en el 10 al 20% de los casos, mientras que en países en vías de desarrollo como el nuestro, se presenta en el 30 a 60% de los casos (15,16).

De acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), en México un gran porcentaje de las pacientes con cáncer de mama se diagnostican en el estadio II (34.4%) y estadios III y IV (42.1%) de la enfermedad, es decir en estadios localmente avanzados y sistémicos (7). El 48% del cáncer de mama localmente avanzado se da en mujeres mayores de 60 años de edad e incluye tumores de lenta evolución (16).

Según los datos reportados por Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) del Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos de América, las tasas de supervivencia a 5 años en pacientes con estadios IIIA y IIIB son de 52% y 48% respectivamente, y la mediana de supervivencia para el estadio III es de 4.9 años (11,17). En cuanto a la supervivencia a 10 años, las tasas van de 30–40% (13).

En relación al diagnóstico del cáncer de mama invasivo, los métodos de rutina utilizados para estudiar la extensión de la enfermedad son el examen clínico, mamografía y ultrasonido. En un número importante de casos, la verdadera extensión de la enfermedad es subestimada, particularmente en cáncer lobular invasivo. La resonancia magnética es la técnica más precisa para determinar el tamaño del tumor, para detectar la presencia de múltiples regiones de invasión ipsilaterales o concurrentes contralaterales. Sin embargo, la resonancia magnética identifica un número significativo de falsos positivos que requieren posterior investigación. La incidencia de tumores multifocales evidenciados por resonancia magnética es más alta que las tasas de recurrencia locales observadas después de cirugía conservadora y radioterapia (18).

En cuanto a los factores pronósticos en cáncer de mama localmente avanzado, estos son similares a los de la enfermedad en estadios tempranos, siendo el involucro de ganglios linfáticos y el tamaño del tumor los más importantes (13). El 20 a 30% de las pacientes con ganglios negativos presentan recurrencia dentro de los primeros 10 años, mientras que recurren el 70% de los pacientes con ganglios axilares positivos. La supervivencia está directamente relacionada con el número de ganglios linfáticos involucrados, aquellas pacientes con 4 o más ganglios afectados tienen un peor pronóstico (13,19).

Con respecto al tamaño del tumor, un estudio reportó que pacientes con tumores mayores a 6 cm tienen una tasa de supervivencia menor a 5 años (57%) comparado con pacientes con tumores entre 5 y 6 cm (72%) (20). Otro estudios reportaron tasas de supervivencia de 16%, 36% y 65% para pacientes con tamaño de tumor mayor a 10 cm, 5-10 cm y menores a 5 cm, respectivamente (21,22).

Histológicamente, el cáncer de mama se divide en *in situ* (ductal y lobular) e invasivo, siendo el más frecuente el carcinoma invasivo sin un tipo especial. Los otros tipos de tumor son tipos morfológicamente diferentes que incluyen el lobular invasivo, tubular, mucinoso, carcinoma metaplásico y carcinoma con características medulares, neuroendócrinas o apócrinas (19,23).

En cuanto a la relación entre los tipos histológicos y los niveles de expresión de los receptores

de estrógenos, en un estudio realizado recientemente se observó que en el carcinoma lobulillar invasivo algunas enzimas del metabolismo de estrógenos se encuentran en concentraciones más bajas comparadas con lo reportado para el carcinoma ductal invasivo, como la sulfatasa de estrógeno y la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1; mientras que otras enzimas como la sulfotransferasa de estrógeno y la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 se encuentran más elevadas en el carcinoma lobulillar invasivo. En cuanto a las concentraciones en tejido de estrona y estradiol, en el carcinoma lobulillar fueron menores que en el ductal y la gran mayoría de genes de respuesta a estrógeno tuvieron la tendencia a estar con expresión más baja en el carcinoma lobulillar, a diferencia de la expresión de *FOXP1* que fue mayor en carcinoma lobulillar invasivo. En estudios previos se ha visto que la expresión de *FOXP1* correlaciona directamente con la expresión de  $ER\alpha$ , por lo que este resultado implicaría que  $ER\alpha$  se encuentra más expresado en carcinoma lobulillar invasivo comparado con carcinoma ductal invasivo (24).

En todos los carcinomas de mama invasivos, independientemente del tipo histológico debe establecerse el grado histológico ya que es un factor pronóstico muy importante. El sistema más utilizado para esto es el de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston y Ellis (*Anexo 2*) (19,23).

En relación a la edad, cuando el cáncer de mama ocurre en adolescentes y adultos jóvenes (edades entre 15 y 39 años), típicamente tiene un peor pronóstico y un fenotipo más agresivo, el tumor es de alto grado y las pacientes se encuentran en estadios avanzados, pocos tumores son positivos a receptor de estrógenos y en algunos estudios se ha visto que tienen mayor expresión de *HER2/NEU* (25). Las diferencias específicas de la edad en cáncer de mama se han abordado en estudios genómicos a gran escala, con resultados ambiguos. Aunque algunos estudios sugieren que el cáncer de mama en adolescentes y adultos jóvenes tiene una biología única, otros han demostrado que su naturaleza agresiva es el resultado de una alta frecuencia de subtipos de cáncer de mama agresivos en pacientes jóvenes. Recientemente, firmas



génicas relacionadas a estroma han mostrado significancia pronóstica en cáncer de mama en adolescentes y adultos jóvenes, sugiriendo que las diferencias en el microambiente del tumor pueden considerarse diferencias edad-específicas en el comportamiento del cáncer de mama (25).

En un estudio, se demostró que las características del tumor en mujeres jóvenes fueron significativamente diferentes de las características del tumor en mujeres de mayor edad. Las mujeres más jóvenes tienen tumores de mayor estadio clínico, mayor tamaño y positivos a receptor de progesterona (26).

### **Tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado**

En los últimos 20 años, se ha llegado a un consenso en cuanto a terapia multimodal, que es la combinación de terapia sistémica, cirugía y radioterapia para el manejo de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado. Aunque la secuencia de administración óptima no ha sido establecida, se cree que el tratamiento sistémico inicial es ventajoso ya que puede aumentar la tasa de resección y conservación de la mama sin comprometer la supervivencia (14).

Aún cuando la resección quirúrgica es la principal modalidad de tratamiento en cáncer de mama, los resultados en el tratamiento de pacientes con enfermedad localmente avanzada no han sido satisfactorios, por lo que la quimioterapia neoadyuvante o preparatoria permite convertir algunos casos de cáncer de mama inoperables en una enfermedad tratable por medio de resección quirúrgica. Actualmente la terapia multidisciplinaria para este grupo de pacientes provee el control local adecuado, la posibilidad de la conservación mamaria, el tratamiento precoz de la enfermedad micrometastásica y el incremento en la tasa de supervivencia en estas pacientes (27,28).

La mayoría de las modalidades de tratamiento neoadyuvante se basan en esquemas que incluyen el uso de antraciclinas (8,22,28–41) con los cuales se han reportado diversas tasas de

respuesta clínica en el 60 a 90% de las pacientes, las cuales incluyen: reducción del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales, respuesta en el tumor primario y no respuesta en los ganglios linfáticos regionales o viceversa (28,33). No obstante, la respuesta clínica completa requiere que no exista enfermedad residual a la exploración física y en los estudios de imagen (mastografía o ultrasonido), tanto en la mama como en los ganglios linfáticos regionales (8,28,42). Esta respuesta ha sido reportada en el 50 a 66% de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que han recibido tratamiento neoadyuvante con antraciclinas y se ha observado que la respuesta clínica completa se incrementa aproximadamente al 80% cuando se agrega algún taxano a la terapia neoadyuvante, especialmente en los esquemas secuenciales (35–38). Sin embargo, aproximadamente 50% de las pacientes consideradas con respuesta clínica completa presenta también respuesta patológica completa, es decir, ausencia de tumor invasor residual (31,39,40).

La valoración de la respuesta patológica del tumor mamario y de los ganglios regionales después de la quimioterapia neoadyuvante ha provisto importante información pronóstica, ya que se ha reportado que las pacientes con respuesta patológica completa, tienen mejor pronóstico debido a mayores periodos libres de enfermedad y mayor supervivencia global al ser comparadas con las pacientes con respuestas patológicas incompletas o sin respuesta (41,43–46).

La valoración de la respuesta a quimioterapia neoadyuvante es un tema de gran importancia en el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado, ya que permite identificar la resistencia tumoral y modificar esquemas de tratamiento (47), además de proveer una excelente plataforma para la medicina traslacional, en donde los avances en genética, genómica, proteómica y biología molecular han permitido efectuar investigaciones de diversos factores predictivos y de pronóstico que puedan ser utilizados en la práctica clínica para que el tratamiento del cáncer se efectúe en una aproximación más individualizada, ya que las

estrategias de tratamiento estándar, en ocasiones resultan en tratamientos innecesarios y exposición a efectos colaterales en gran número de mujeres (48,49).

### **Biomarcadores en cáncer de mama**

De forma rutinaria en la práctica clínica se utilizan biomarcadores como ER $\alpha$ , PR (receptor de progesterona) y HER2/NEU (miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico 2). Estos biomarcadores permiten predecir la respuesta del tumor con la terapia hormonal y también se utilizan como factores pronósticos para recurrencia y desenlace a largo plazo. Cerca de 80% de los tumores de mama son ER $\alpha$  positivos y aproximadamente el 77% de los tumores ER $\alpha$  y PR positivos responden a terapia hormonal con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa. Sin embargo, 40% de los tumores de mama son ER $\alpha$  positivos y PR negativos, lo que ocasiona que el tumor responda menos a la terapia hormonal. En cuanto a HER2/NEU, el 13 a 20% de los tumores de mama son positivos y, de este porcentaje, aproximadamente la mitad son negativos a ER $\alpha$  y PR; cuando este biomarcador se encuentra positivo es un factor de mal pronóstico y permite predecir una buena respuesta al tratamiento sistémico con trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal específico anti-HER2. Aproximadamente 10 a 15% de los tumores de mama son negativos para ER $\alpha$ , PR y HER2/NEU por lo que se denominan triple negativo (23,50,51).

Si bien ER $\alpha$  es un importante biomarcador de respuesta a terapia hormonal en el cáncer de mama, la definición del estado del receptor de estrógenos en el cáncer de mama se ha vuelto más compleja desde que se descubrió que existen dos tipos de receptores de estrógenos: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (52).

En la glándula mamaria madura, ER $\beta$  se encuentra más ampliamente expresado en células epiteliales y células estromales, incluyendo fibroblastos y células endoteliales, mientras que ER $\alpha$  se observa en células epiteliales. Al realizar inmunohistoquímica la positividad de ER $\beta$  ha

sido de 50-70% en tumores con cáncer de mama (53). Varios estudios han sugerido que la función de ER $\beta$  puede ser la de un factor inhibidor de carcinogénesis, porque su expresión se ha observado reducida en tejido tumoral de mama al compararlo con tejido sano o con enfermedad benigna de la mama (54). Se ha encontrado que el 94% de células normales de mama, el 76.7% de células de hiperplasia ductal, el 70% de células de carcinoma ductal *in situ* y el 60% de las células de cáncer invasivo, expresan ER $\beta$  (53).

Con respecto a la función de ER $\beta$ , se ha observado que cuando ER $\alpha$  actúa como activador transcripcional de elementos de respuesta a estrógeno, la función de ER $\alpha$  es suprimida por dimerización con ER $\beta$  (53). En cuanto a la expresión de ER $\beta$  en relación con ER $\alpha$ , el tipo de tumor que se observa con más frecuencia, en cerca del 60% de los casos, es el que presenta ER $\alpha$  y ER $\beta$  positivos; mientras que los fenotipos ER $\alpha$  negativo/ER $\beta$  positivo, ER $\alpha$  positivo/ER $\beta$  negativo y ER $\alpha$  negativo/ER $\beta$  negativo tienen una frecuencia similar que oscila entre 10-20% (54).

A la fecha muchos investigadores han tratado de definir el significado de la expresión de ER $\beta$  como un factor pronóstico y si bien ha habido resultados con gran variabilidad en los estudios debido al uso de diferentes anticuerpos, tamaños de muestra muy pequeños o diferentes criterios para la interpretación de la inmunohistoquímica, todos han encontrado que ER $\beta$  correlaciona con un buen pronóstico (53,55,56). Sin embargo, hablando específicamente de una de las isoformas de ER $\beta$ , se ha reportado que ER $\beta$ 1 positivo se asocia con tumores de mama más agresivos, como los HER2 positivos y triple negativos (57).

Lo antes mencionado se ha observado en relación a la expresión de ER $\beta$  en localización nuclear; sin embargo, es importante resaltar también el papel de ER $\beta$  citoplásmico como factor pronóstico en cáncer de mama (57–61). En un estudio realizado por Shaaban y cols., se observó que la localización de la isoforma ER $\beta$ 2 determinaba el pronóstico, ya que su expresión nuclear predijo una buena respuesta clínica, mientras que la expresión citoplásmica

predijo una peor supervivencia global (58).

Un estudio de cohorte en la que se incluyeron 911 pacientes, reportó que cuando se consideró ER $\beta$  como positivo en muestras con >10% de núcleos teñidos, se asociaba a ER $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ), pero no se encontró asociación con la supervivencia global ni con periodo libre de enfermedad. Cuando se consideró positivo en base a >75% de núcleos teñidos, ER $\beta$  se asoció con la expresión de ER $\alpha$  y PR, grado histológico bajo, menor tamaño tumoral y ausencia de afectación de ganglios linfáticos ( $p = 0.03$ ) (62). En el análisis de supervivencia, se encontró que la expresión de ER $\beta$  se asociaba inversamente con el periodo libre de enfermedad (LogRank  $P = 0.0005$ , HR 0.62: 95% CI 0.42-0.90;  $p = 0.013$ ). En el análisis estratificado por quimioterapia, la expresión de ER $\beta$  se asoció significativamente con un menor riesgo de recurrencia en los sujetos que recibieron quimioterapia (Log Rank  $P = 0.0005$ , HR 0.31: 95% CI 0.15-0.63;  $p = 0.001$ ) (62).

Además de ER $\beta$ 1 y ER $\beta$ 2, existen otras 3 isoformas del ER $\beta$ . ER $\beta$ 3 parece estar restringida a testículo, mientras que ER $\beta$ 4 parece no existir en mama y ER $\beta$ 5 sí se encuentra altamente expresada en mama, aunque sólo se ha encontrado asociada su expresión a nivel nuclear con la supervivencia de las pacientes si se tiñen >65% de las células nucleares y a nivel citoplásmico su inmunorreactividad es muy poco frecuente (53,58).

Además de los biomarcadores antes mencionados, dada la considerable importancia del cáncer de mama en salud pública, es crucial identificar nuevos biomarcadores con el potencial de mejorar el diagnóstico temprano y predecir el pronóstico de las pacientes, resistencia a tratamiento y opciones de tratamiento. A pesar de los numerosos artículos publicados sobre biomarcadores en cáncer de mama, solo están disponibles muy pocos biomarcadores confiables para uso en la práctica clínica.

La detección del cáncer de mama en etapas tempranas es muy importante, ya que es más curable que la enfermedad metastásica; de igual manera, es importante el poder predecir la

ocurrencia de metástasis antes de que se manifieste en las pacientes. A la fecha, varios biomarcadores potenciales han cobrado atención en relación a esos dos aspectos: la combinación de uPA (sistema activador del plasminógeno dependiente de urocinasa, PAI (inhibidor de activador de plasminógeno) y TF (antígeno Thomsen-Friedenreich) para diagnóstico temprano; mamaglobina, osteopontina, snail, twist, Zeb-1, FGFR (receptores de factores de crecimiento de fibroblastos), PTEN y SIRT para predicción de enfermedad metastásica (63).

De igual manera, es importante encontrar biomarcadores predictivos para determinar el tratamiento adecuado para cada paciente específico en el momento adecuado. Algunos biomarcadores potenciales que se han estudiado son: Citocromo P450 2D6 (CYP2D6), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfonato-3-cinasa (PIK3CA), receptor alfa del ácido retinoico (RARA), transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), TIMP-1 y Lin28 (63).

También se han estudiado los miRNAs, como potenciales biomarcadores, ya que la expresión de uno solo de ellos puede variar entre los diferentes tejidos y los tumores tienen patrones de expresión únicos, lo que puede explotarse para diagnóstico de cáncer de mama, pronóstico y respuesta a tratamiento. Varios estudios han indentificado miRNA específicos elevados en sangre y tejido tumoral en pacientes con cáncer de mama. Entre estos se encuentran: miR-21, miR-155, miR-210, miR-29c, miR-196a, miR-213, miR-191, miR-203, miR-29b and miR-93 que están regulados a la alta en tejido tumoral, no así en tejido sano; mientras que miR-125b, miR-145, miR-100, miR-10b, Let-7a-2, miR-205, miR-497 and miR-193 se han encontrado regulados a la baja en tejido tumoral. A pesar de los avances en la comprensión de las diferencias de expresión de los miRNAs, el reto ahora es comprender cuales son las consecuencias de estas diferencias en cuanto a la mejoría de las herramientas clínicas para diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento de pacientes con cáncer de mama (64).

Otros biomarcadores que se han estudiado están relacionados con la vía de PI3K/Akt/mTOR, la cual se ha encontrado como la vía más alterada en cáncer (14,63). También se han estudiado

otros biomarcadores relacionados con los mecanismos de regulación del ciclo celular involucrados en oncogénesis y desarrollo de resistencia a tratamiento, como CDK 4/6 (14).

### **BIK (*BCL-2 interacting killer*)**

Nuestro equipo de trabajo cobró interés en el estudio del gen *BIK* debido a un estudio con el objetivo de identificar un perfil de expresión génica diferencial en pacientes con cáncer de mama en distintos estadios comparado con sujetos sin cáncer de mama mediante microarreglos de cDNA (65). En ese estudio se observó que de todos los genes relacionados con apoptosis, tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos, *BIK* se encontraba sobreexpresado en el 90% de las muestras de pacientes con cáncer de mama. Debido a esa consistente sobreexpresión en tejido de cáncer mamario, se realizó la validación de su expresión mediante RT-PCR e inmunohistoquímica, por lo que nuestro grupo de estudio consideró continuar sobre esa línea de investigación por considerarse un buen candidato como posible biomarcador para cáncer de mama (65).

El gen *BIK/NBK* se localiza en el cromosoma 22q13.3 (MIM: \*603392) y codifica para una proteína proapoptótica que pertenece a la familia de proteínas BCL-2 por presentar únicamente el dominio BH3. Aparentemente la proteína BIK induce apoptosis por la vía mitocondrial, sin embargo también hay reportes de su participación en muerte celular con características autofágicas. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en donde se analizaron muestras de tejido canceroso mamario mediante microarreglos de expresión, se encontró sobre-expresión de este gen en 90% de las muestras analizadas (65). Debido a este hallazgo y la evidencia de una posible relación entre los niveles de estrógenos y la expresión del gen *BIK/NBK* en cultivos de células MCF-7 que es una línea celular mamaria estrógeno dependiente (66), se realizó un estudio para determinar la asociación de la expresión del gen *BIK/NBK* a nivel mRNA con la expresión de los receptores de estrógenos alfa en tejido canceroso mamario, encontrando una correlación directa y estadísticamente significativa, lo

que pudiera tener implicaciones clínicas importantes, ya que los pacientes con ER $\alpha$ + mostraron mayor expresión del gen *BIK/NBK* y dada la función pro-apoptótica de este último, esto sería sugestivo de la activación de apoptosis en las células cancerosas mamarias mediada por ER $\alpha$ + (67). Consideremos que es posible que los pacientes que muestran mayor expresión de *BIK/NBK* tengan una mejor respuesta terapéutica a tratamiento antiestrogénico que aquellos con menor expresión de *BIK/NBK*.

En un estudio reciente, se encontró que niveles elevados de mRNA *BIK/NBK* en tejido canceroso mamario previo a recibir tratamiento se asocian con una menor supervivencia, siendo un factor pronóstico independiente para recurrencia y muerte. En ese mismo estudio, se encontró que niveles elevados de la proteína BIK se asociaron también con menor supervivencia global y menor periodo libre de enfermedad (68).

### **GRP78 (*glucose-related protein, 78 kDa*)**

GRP78 actúa en la misma vía que BIK en relación a la apoptosis. Existen reportes en la literatura donde BIK y GRP78 han mostrado perfiles de expresión génica y proteica diferencial en tejido canceroso mamario, además de su importante participación en la fisiopatología del cáncer (65–67,69–75).

*GRP78* localizado en el cromosoma 9q33-q34.1 (MIM: \*138120), codifica para GRP78 (*glucose-regulated protein, 78 kDa*), proteína de unión a la cadena pesada de las inmunoglobulinas (biP), la cual es un regulador importante de la función del retículo endoplásmico debido a su papel en el plegamiento y ensamblamiento proteico; además marca las proteína mal plegadas para su degradación y controla la activación de sensores de estrés transmembranales del retículo endoplásmico (76). GRP78 es una proteína chaperona esencial, por lo que está expresada constitutivamente en una gran variedad de niveles en la mayoría de los tipos celulares. La inducción de GRP78 ha sido ampliamente usada como marcador para estrés de retículo endoplásmico y de producción de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).



Debido a sus propiedades antiapoptóticas e inducción de estrés, GRP78 representa un componente importante en la supervivencia celular (77). La evidencia demuestra que el microambiente de los tumores presenta estrés fisiológico del retículo endoplásmico y la UPR es crucial para la supervivencia de las células tumorales expuestas a hipoxia persistente (78). La sobreexpresión de GRP78 ha sido reportada en muchos tipos de líneas celulares de cáncer y biopsias tumorales, incluyendo cáncer de mama (69,70). La inducción de GRP78 en tumores sólidos puede ser atribuida al estrés generado por la privación de estrógenos y anoxia debido a la pobre vascularización de los tumores, así como a la alta tasa de utilización de glucosa en células de cáncer. Estudios *in vitro* han mostrado que GRP78 protege a las células cancerosas de los agentes quimioterapéuticos (70). En un panel de líneas celulares de cáncer de mama, la inducción de GRP78 fue más prominente en las sublíneas resistentes a inhibidores de topoisomerasa II como Adriamicina y Etopósido (71). Los inhibidores de topoisomerasa estabilizan los complejos de topoisomerasa-DNA, resultando en ruptura del DNA y desencadenamiento de la cascada apoptótica, incluyendo la activación de BAX y caspasa-7 (70,72,73).

En una variedad de líneas celulares de cáncer, tumores sólidos y especímenes de biopsia de cáncer, incluyendo cáncer de mama, el nivel de expresión de GRP78 se ha encontrado muy elevado, correlacionando con malignidad, metástasis y resistencia a fármacos. GRP78 se encuentra sobreexpresado en lesiones malignas de mama, no así en lesiones benignas y se asocia con resistencia a fármacos (77).

Diversos estudios demuestran que GRP78 confiere resistencia contra apoptosis mediada por Adriamicina y Etopósido en células de cáncer, al menos en parte, a través de la inhibición de BAX y activación de caspasa-7. La fuerte relación *in vitro* entre sobreexpresión de GRP78 y el desarrollo de resistencia a medicamentos dirigidos contra topoisomerasa, sugiere que la sobreexpresión de GRP78 en tumores puede ser un marcador de resistencia a Adriamicina y Etopósido en pacientes con cáncer de mama. En un estudio realizado por Lee y colaboradores,

encontraron que de 127 muestras de tejido canceroso mamario, el 65% sobre-expresaban la proteína GRP78. En un seguimiento de 16 meses a partir del inicio de la quimioterapia con Adriamicina, las mujeres que no presentaron expresión de GRP78 tuvieron una probabilidad de permanecer libres de recurrencia de 0.80, a diferencia de las mujeres que sobre-expresaron GRP78 en donde la probabilidad de permanecer libres de recurrencia fue de 0.48 (HR, 1.78; 95% CI, 0.77-4.14) (74,75).

En un estudio reciente en el que se trató de identificar un panel de biomarcadores para diferenciar el carcinoma ductal subtipo luminal B por estadios tempranos y avanzados, se encontró que GRP78 se expresaba en mayor cantidad en estadios avanzados comparado con estadios tempranos (79).

Se ha demostrado que GRP78 y no otras chaperonas de retículo endoplásmico, forma un complejo con BIK. La sobreexpresión de GRP78 inhibe a BIK, así como causa la activación de BAX y apoptosis mediada por privación de estrógenos. Por el contrario, la supresión endógena de GRP78 mediante siRNA sensibiliza las células de cáncer de mama hacia apoptosis inducida por privación de estrógenos (77).

En el estudio llevado a cabo en México en 2011 por Corres M. y López-Muñoz E., et al. (datos no publicados), en donde se incluyeron muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, se encontró que la mediana de expresión en porcentaje de las proteínas BIK y GRP78 de las muestras analizadas (n=15) fue de 40 y 80% respectivamente. En este mismo estudio se realizó comparación en la expresión de BIK y GRP78 de acuerdo al tipo de patrón de expresión de inmunohistoquímica, con el estadio clínico, al haber requerido o no radioterapia preoperatoria y al tamaño tumoral. Aunque BIK se expresó en mayor proporción en los casos con factores de alto riesgo, ninguna de las comparaciones fueron estadísticamente significativas. Con respecto a GRP78 la expresión fue similar en todas las comparaciones. En mujeres mayores de 40 años, BIK se expresó en el 40%, mientras que GRP78 en el 90%; en mujeres menores de 40 años, BIK se expresó en el 45% y GRP78 en el

50%. En cuanto al estadio clínico, sólo hubieron del estadio IIB y IIIA, encontrándose en el primero una expresión de BIK en el 90% de los casos y de GRP78 en el 100%; mientras que en el estadio IIIA el 40% de los tumores expresó BIK y el 70% expresó GRP78.

### **BECN1 (*Beclin-1*)**

El gen *BECN1* (*Beclin-1*), con locus en el cromosoma 17q21 (MIM: \*604378), ha sido identificado como efector esencial de autofagia celular y se le ha considerado como un nuevo miembro de la familia de genes *BH3-only* (80). Debido al incremento observado en la tumorigénesis espontánea con proliferación anormal de células mamarias epiteliales en ratones con pérdida monoalélica de *becn-1* y la presencia de deleciones monoalélicas de *BECN1* en cáncer de mama en humanos, se ha propuesto su función como supresor de crecimiento tumoral (81–83). También se ha reportado un bajo nivel de expresión de *BECN1* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y en tejido epitelial canceroso mamario, además de que el restablecimiento de *BECN1* en la línea celular MCF7 inhibe la tumorigénesis (84). Won y colaboradores recientemente reportaron la disminución de la expresión de *BECN1* en tejido tumoral mamario comparado con tejido mamario normal adyacente. En 125 muestras de tejido canceroso mamario invasivo, analizadas por inmunohistoquímica en microarreglo de tejido, encontraron expresión de *BECN1* en 42.4% de los casos. La expresión de *BECN1* mostró correlación inversa con la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2, por lo que es probable que *BECN1* juegue un papel importante en la inhibición del desarrollo de cáncer de mama y que esta inhibición esté relacionada con la proteína BCL-2 (85). Por otro lado, hay evidencia de la participación de la vía autofágica, la cual incluye a *BECN1* en la regulación de la respuesta a tratamiento endócrino en células cancerosas mamarias (86,87).

Por otra parte, también se ha reportado incremento en la expresión de *BECN1* en células de cáncer colorectal y gástrico al ser comparadas con células normales (88).

### **Técnicas empleadas para búsqueda de potenciales biomarcadores**

Las primeras técnicas a gran escala aplicadas en el campo del cáncer fueron los microarreglos de DNA para análisis de expresión de mRNA (RNA mensajero) (89). La proteómica, que es una caracterización a gran escala del complemento proteico de una célula, tejido u organismo (90), tiene el potencial de complementar y aumentar la información generada por la genómica en el cáncer de mama, ya que los niveles de mRNA no correlacionan necesariamente con la abundancia de la proteína correspondiente. Se añade otra complejidad por las modificaciones post-traduccionales como fosforilación o acetilación, entre otras. Estas modificaciones no son detectables a nivel de mRNA pero juegan un papel importante en la estabilidad, localización, interacciones y función de las proteínas. Además, las proteínas representan blancos terapéuticos más accesibles y relevantes que los ácidos nucleicos (89–91).

La proteómica se puede dividir en proteómica clásica, proteómica estructural y proteómica funcional; las dos últimas de interés principal para el diseño de fármacos una vez conocida la expresión diferencial. La proteómica clásica por su parte tiene la finalidad de encontrar nuevos biomarcadores, basado en su expresión diferencial. Como parte de ese abordaje, existen técnicas para separación (electroforesis y cromatografía), identificación (espectrometría de masas) y validación de proteínas (Western Blot e inmunohistoquímica) (89–91).

Dado que la finalidad de este estudio no es descubrir nuevas proteínas relacionadas con el cáncer de mama, sino tratar de asociar los niveles de expresión de proteínas ya conocidas como son BIK, GRP78 y BECN1, la técnica que se utilizará será inmunohistoquímica en microarreglos de tejido.

### **Inmunohistoquímica en microarreglos de tejido**

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) detectan antígenos en secciones de tejido mediante reacciones químicas e inmunológicas. La inmunohistoquímica es una técnica mediante la cual se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo

(monoclonal ó policlonal, IgG ó IgM) específico contra él. La técnica esta basada en la reacción antígeno–anticuerpo y por ello el anticuerpo primario que se utilice debe haber sido generado en una especie diferente a la que se está estudiando. La reacción que se produce sólo es visible si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (92). En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color a un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color café), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos secundarios o sustancias como biotina o proteína A (93).

Esta técnica es altamente sensible y específica, y puede detectar una amplia variedad de antígenos en múltiples especies. La IHQ tiene el potencial de teñir o demostrar un rango casi ilimitado de componentes de un tejido, sin embargo se necesita ser muy riguroso en la técnica desde la adquisición del espécimen, fijación del tejido, tinción, interpretación y reporte de los resultados. Actualmente, la inmunohistoquímica se puede llevar a cabo de forma manual o mediante plataformas automatizadas. La ventaja de realizarlo de forma automatizada es que se garantiza una mayor consistencia y calidad (92,93).

Ante la necesidad de identificar nuevos marcadores moleculares con potencial significado clínico de forma más rápida, se han empleado técnicas de alto rendimiento y a la larga ha llevado al desarrollo de abordajes que permitan validar de forma más rápida y en un gran número de muestras. Una de estas técnicas, el microarreglo de tejidos (TMA) fue descrita hace 20 años, y en 1998 fue modernizada. Esta técnica permite el análisis simultáneo, a nivel de DNA (mediante hibridación *in situ* con fluorescencia), mRNA (mediante hibridación *in situ*), o proteínas (inmunohistoquímica), de hasta 1,000 muestras de tumor arregladas en una laminilla. Consiste en obtener cilindros de 0.6 mm de diámetro de bloques de tejido embebido en

parafina, los cuales son colocados en un nuevo bloque de parafina que luego es cortado en secciones muy delgadas (100 a 200 por bloque) para su análisis (89). A todas las muestras se les puede realizar de forma simultánea una inmunohistoquímica con un antígeno específico y se pueden analizar morfológicamente. La inmunotinción es interpretada posteriormente, mediante una escala o puntuación. Las ventajas de esta técnica comparada con la inmunohistoquímica en secciones de tejido completas es que consume menos tiempo, es menos laboriosa y más económica, y todas las muestras son analizadas en condiciones experimentales similares lo que lleva a obtener datos más reproducibles y rigurosos (89,92). A pesar de esto, se ha criticado la representatividad de una pequeña muestra (de 0.6 mm de diámetro) con respecto a un tumor potencialmente heterogéneo, comparado con una sección clásica de tejido más grande. Sin embargo, varios estudios han demostrado una excelente concordancia para inmunohistoquímica cuando se han seleccionado dos o más muestras de tejido de forma cuidadosa por un patólogo, al momento de realizar el microarreglo de tejido (89). De igual forma, se ha criticado la interpretación de las inmunohistoquímicas al llevarse a cabo de forma manual, en relación a la subjetividad y reproducibilidad. Actualmente existen programas para el análisis e interpretación cuantitativa y automatizada de las inmunohistoquímicas que han vuelto este proceso más objetivo y reproducible (89,92).

Así, debido a la evidencia científica y a la creciente necesidad de marcadores de pronóstico, que permitan identificar grupos de pacientes con buen y mal pronóstico que puedan beneficiarse de ciertas terapias, decidimos evaluar el valor pronóstico de la expresión proteica de BIK, BECN1 y GRP78 mediante inmunohistoquímica, considerando como el primer evento de desenlace la respuesta clínica y patológica, y como segundo evento de desenlace la supervivencia a 3 años, en un grupo de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado.

## JUSTIFICACIÓN

En México y en el mundo, el cáncer de mama ocupa uno de los primeros lugares de incidencia entre todos los tipos de cáncer y también es una de las primeras causas de mortalidad.

A pesar de los esfuerzos llevados a cabo en nuestro país, para tratar de hacer un diagnóstico temprano de este cáncer, a diferencia de lo que se observa en países desarrollados, se observa todavía una alta frecuencia de mujeres con cáncer de mama en estadios localmente avanzados al momento del diagnóstico, de ahí la importancia de llevar a cabo estudios en este grupo de pacientes.

Existe evidencia que el estudio de la expresión de proteínas en tejido canceroso mamario puede proveer información útil para descifrar las vías que participan en el inicio, desarrollo y progresión del cáncer.

Con este estudio, pretendemos abordar la vía de apoptosis mediada por deprivación de estrógenos, así como también la vía de autofagia, estudiando tres proteínas involucradas en éstas, BIK, GRP78 y BECN1, mismas que han demostrado interaccionar entre sí en estudios *in vitro*, y que se han estudiado *in vivo* de forma individual a nivel de expresión de mRNA y también a nivel de proteína, encontrándose resultados contradictorios o paradójicos a los observados a nivel de mRNA.

Es por eso que nos planteamos este estudio, en el que pretendemos conocer la forma en la que se expresan los biomarcadores BIK, GRP78 y BECN1 en el grupo específico de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, y su correlación con la respuesta clínica o patológica al tratamiento así como la supervivencia a 3 años.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial y México no es la excepción. Aún cuando se han tratado de implementar programas para la detección temprana del cáncer de mama, en nuestro país es frecuente detectar cáncer de mama en estadios localmente avanzados con una prevalencia del 30 a 60%. El tratamiento para este grupo de pacientes es multidisciplinario e incluye el uso de quimioterapia neoadyuvante, en donde la valoración de la respuesta patológica ha permitido identificar la resistencia tumoral y modificar esquemas de tratamiento, además de proveer una excelente plataforma para la medicina traslacional, en donde los avances en genética, genómica, proteómica y biología molecular han permitido efectuar investigaciones de diversos factores predictivos y de pronóstico que puedan ser utilizados en la práctica clínica para que el tratamiento del cáncer se efectúe en una aproximación más individualizada.

Aún cuando se han identificado biomarcadores moleculares expresados diferencialmente en tejido canceroso mamario y tejido adyacente normal, así como la evidencia de su participación en la fisiopatología del cáncer, la traslación de los datos obtenidos en la investigación básica a la práctica clínica ha sido más difícil de lo que se pensaba. En la actualidad se ha convertido en un objetivo principal en la investigación del cáncer de mama, la identificación de biomarcadores que permitan diferenciar a los pacientes con buen pronóstico de aquellos con mal pronóstico. Por esta razón nos planteamos las siguientes preguntas de investigación.



## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

En mujeres con cáncer de mama localmente avanzado (estadios IIB, IIIA, IIIB y IIIC de acuerdo al TNM), de los hospitales UMAE HGO No. 4 Luis Castelazo Ayala y HGO No. 3, CMN La Raza, IMSS:

1. ¿Cuál es la asociación entre la expresión de las proteínas GRP78, BIK, BECN1 y la respuesta clínica y patológica a tratamiento neoadyuvante?
2. ¿Cuál es la asociación entre la expresión de las proteínas GRP78, BIK, BECN1 y la supervivencia a 3 años?
3. ¿Cuál es la asociación entre la expresión de las proteínas GRP78, BIK, BECN1 y otros factores clínicos o patológicos de valor pronóstico (estadio tumoral al momento del diagnóstico, número de ganglios axilares con metástasis, tamaño tumoral, estado de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2/NEU)?
4. ¿Cuál es la asociación entre la expresión a nivel proteína de GRP78, BIK, BECN1 y la probabilidad de recurrencia?

## HIPÓTESIS

En mujeres con cáncer de mama localmente avanzado (estadios IIB, IIIA, IIIB y IIIC de acuerdo al TNM), de los hospitales UMAE HGO No. 4 Luis Castelazo Ayala y HGO No. 3, CMN La Raza, IMSS:

- Existe una asociación estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la menor expresión de GRP78, y la sobre-expresión de BIK y BECN1 en las muestras de tejido tumoral con la respuesta clínica y patológica completa.
- Existe una asociación estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la sobre-expresión de GRP78, y menor expresión de BIK y BECN1 con menor supervivencia a 3 años.
- Existe una asociación estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la expresión a nivel proteína de BIK, BECN1, GRP78 y otros factores de valor pronóstico reportados en la literatura y que actualmente son de uso clínico (estadio tumoral al momento del diagnóstico, número de ganglios axilares con metástasis, tamaño tumoral, estado de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2/NEU).
- Existe una asociación estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la sobreexpresión a nivel proteína de GRP78 con mayor probabilidad de recurrencia, y entre la sobreexpresión de BIK y BECN1 con una mayor probabilidad de permanecer libre de recurrencia.

## OBJETIVOS

En mujeres con cáncer de mama localmente avanzado (estadios IIB, IIIA, IIIB y IIIC de acuerdo al TNM), de los hospitales UMAE HGO No. 4 Luis Castelazo Ayala y HGO No. 3, CMN La Raza, IMSS:

- Medir (mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido con el sistema automatizado Ventana Benchmark GX) y asociar la expresión a nivel proteína de GRP78, BIK y BECN1 con la respuesta clínica y patológica de un grupo de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado.
- Medir (mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido con el sistema automatizado Ventana Benchmark GX) y asociar la expresión a nivel proteína de GRP78, BIK y BECN1 con la supervivencia a 3 años de un grupo de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado.
- Medir (mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido con el sistema automatizado Ventana Benchmark GX) y asociar la expresión a nivel proteína de GRP78, BIK y BECN1 con otros factores de valor pronóstico reportados en la literatura y que actualmente son de uso clínico (estadio tumoral al momento del diagnóstico, número de ganglios axilares con metástasis, tamaño tumoral, estado de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2/NEU).
- Medir (mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido con el sistema automatizado Ventana Benchmark GX) y asociar la expresión a nivel proteína de GRP78, BIK y BECN1 con la probabilidad de permanecer libre de recurrencia.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

Estudio observacional, analítico y retrospectivo. Se incluyeron 109 muestras de tejido tumoral embebido en parafina de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado (estadios clínicos IIB, IIIA, IIIB y IIIC), de los hospitales UMAE HGO No. 4 Luis Castelazo Ayala y HGO No. 3, CMN La Raza, IMSS que cumplieron los siguientes criterios de selección:

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Muestras de tejido canceroso mamario obtenidas previo al inicio de tratamiento con quimioterapéuticos o terapia hormonal (moduladores selectivos de receptor de estrógenos como tamoxifeno e inhibidores de aromatasa).
- Muestras de pacientes con acceso al expediente clínico.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Muestras cuya laminilla y/o bloque de parafina fuera de mala calidad.
- Muestras de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado que hubieran utilizado anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal en los 3 meses previos a la toma de biopsia de tejido tumoral (de acuerdo al expediente clínico), que estuvieran recibiendo quimioterapia como parte del tratamiento de otra neoplasia o que tuvieran sospecha de cáncer de mama hereditario.
- Muestras de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama inflamatorio.

#### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Muestras en las que el material de la laminilla era insuficiente para su procesamiento.

## VARIABLES DE ESTUDIO

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición
<b>Edad</b>	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de una persona	Años que han transcurrido desde el nacimiento de una persona hasta el diagnóstico de cáncer de mama	Cuantitativa continua	Años
<b>Fecha del diagnóstico</b>	Fecha en la que se efectuó el diagnóstico de cáncer de mama	Mes y año consignados en el expediente clínico en la que se confirmó el diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado	Nominal (mes) Cuantitativa (año)	Mes Año
<b>Estadio clínico</b>	Etapas clínicas del cáncer de mama	Estadio de la enfermedad según la clasificación TNM	Ordinal	IIB=1 IIIA=2 IIIB=3 IIIC=4
<b>Quimioterapia neoadyuvante</b>	Tratamiento sistémico previo a la cirugía que puede reducir el tamaño del tumor	Tratamiento quimioterapéutico utilizado previo a la cirugía para cáncer de mama	Nominal dicotómica	0=No 1=Si
<b>Tipo de quimioterapia neoadyuvante</b>	Tipo de tratamiento sistémico previo a la cirugía que puede reducir el tamaño del tumor	Tipo de tratamiento quimioterapéutico utilizado previo a la cirugía para cáncer de mama	Nominal	Antraciclinas=1 Taxanos=2 Trastuzumab=3 Antraciclinas y taxanos=4 Antraciclinas y trastuzumab=5 Taxanos y trastuzumab=6 Antraciclinas, taxanos y trastuzumab=7
<b>Tipo histológico</b>	Clasificación del cáncer de mama según su lugar de origen (ductal o lobulillar), su carácter ( <i>in situ</i> o invasivo) y patrón estructural	Reporte en expediente de la clasificación histológica de cáncer de mama	Nominal	Ductal=1 Lobulillar=2 Otro (Especificar)=3
<b>Tamaño tumoral</b>	Medición directa del tumor en la pieza quirúrgica	Medición del tamaño del tumor en fresco en tres planos	Cuantitativa continua	Milímetros

<b>Ganglios axilares metastásicos</b>	Número de ganglios axilares positivos para células cancerosas	Número de ganglios axilares positivos para células cancerosas	Cuantitativa discreta	Número de ganglios metastásicos
<b>Expresión de la proteína BIK</b>	Cantidad relativa de expresión de la proteína BIK (160 aminoácidos). Es una proteína proapoptótica con dominio BH3	Expresión de la proteína BIK mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno-anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado	Nominal dicotómica	<b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a <10% 2=10 a <50% 3=50 a 100%  POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás
<b>Expresión de la proteína BECN1</b>	Cantidad relativa de expresión de la proteína BECN1 (450 aminoácidos). BECN1 es una proteína que participa en la regulación de autofagia, con un papel importante en la tumorigénesis	Expresión de la proteína BECN1 mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno- anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado	Nominal dicotómica	<b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a <10% 2=10 a <50% 3=50 a 100%  POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás

<p><b>Expresión de la proteína GRP78</b></p>	<p>Cantidad relativa de expresión de la proteína GRP78 (654 aminoácidos) GRP78 pertenece a la familia de proteínas de choque de calor (HSP70)</p>	<p>Expresión de la proteína GRP78 mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno- anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado</p>	<p>Nominal dicotómica</p>	<p><b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a &lt;10% 2=10 a &lt;50% 3=50 a 100%</p> <p>POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás</p>
<p><b>Expresión de la proteína ERβ</b></p>	<p>Cantidad relativa de expresión de la proteína ERβ (530 aminoácidos) ERβ es un factor de transcripción de receptores nucleares, forma homodímeros o heterodímeros con otros receptores</p>	<p>Expresión de la proteína ERβ mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno- anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado</p>	<p>Nominal dicotómica</p>	<p><b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a &lt;10% 2=10 a &lt;50% 3=50 a 100%</p> <p>POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás</p>

<p><b>Expresión de la proteína ERα</b></p>	<p>Cantidad relativa de expresión de la proteína ERα (595 aminoácidos). ERα es un factor de transcripción activado por ligandos, compuesto de diversos dominios para la unión de hormonas, DNA y activación de la transcripción</p>	<p>Expresión de la proteína ERα mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno- anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado</p>	<p>Ordinal</p>	<p><b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a &lt;10% 2=10 a &lt;50% 3=50 a 100%</p> <p>POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás</p> <p><b>Escala ASCO</b> Porcentaje de células y grado de tinción, considerando como positivas aquellas muestras que tengan el 1% o más de núcleos de células tumorales inmunorreactivos</p>
<p><b>Expresión de la proteína PR</b></p>	<p>Cantidad relativa de expresión de la proteína PR (933 aminoácidos) PR es un receptor de esteroides, que media los efectos fisiológicos de la progesterona</p>	<p>Expresión de la proteína PR mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno- anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado</p>	<p>Ordinal</p>	<p><b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa <b>Escala B</b> 1=0 a &lt;10% 2=10 a &lt;50% 3=50 a 100%</p> <p>POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás</p> <p><b>Escala ASCO</b> Porcentaje de células y grado de tinción, considerando como positivas aquellas muestras que tengan el 1% o más de núcleos de células tumorales inmunorreactivos</p>



<p><b>Expresión de la proteína HER2/NEU</b></p>	<p>Cantidad relativa de expresión de la proteína HER2/NEU (1255 aminoácidos) HER2/NEU es miembro de los receptores tirosina/cinasa de los factores crecimiento epidérmico</p>	<p>Expresión de la proteína HER2/NEU mediante inmunohistoquímica (reacción antígeno-anticuerpo) en bloques de parafina de tejido canceroso mamario localmente avanzado</p>	<p>Ordinal</p>	<p><b>Escala A</b> 1=tinción débil 2=tinción moderada 3=tinción intensa</p> <p><b>Escala B</b> 1=0 a &lt;10% 2=10 a &lt;50% 3=50 a 100%</p> <p>POSITIVO=1 cuando las 2 escalas sean 2 o 3 NEGATIVO=0 Todos los demás</p> <p><b>Escala ASCO</b> 0 (negativo): No se observa tinción o la tinción de la membrana es incompleta y apenas perceptible en &lt;10% de las células 1+ (también negativo): tinción incompleta de la membrana que es apenas perceptible en &gt;10% de las células 2+ (dudoso): tinción circunferencial de la membrana completa e intensa en &lt;10% de las células o tinción circunferencial incompleta o débil/moderada en &gt;10% de las células 3+ (positivo): tinción circunferencial de la membrana completa, intensa en &gt;10% de las células</p>
---	---	--	----------------	---

<b>Respuesta patológica a tratamiento</b>	Respuesta patológica posterior a la quimioterapia neoadyuvante	Ausencia de cualquier evidencia macroscópica de tumor a la inspección del tejido mamario y ganglios axilares	Nominal	Incompleta=0 Completa=1
<b>Respuesta clínica a tratamiento</b>	Respuesta clínica posterior a la quimioterapia neoadyuvante	Nula evidencia de tumor o al menos 50% de reducción en diámetros perpendiculares de las lesiones medibles, sin desarrollo de nuevas lesiones; a la exploración física previo a la cirugía y posterior al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante	Ordinal	No respuesta= 0 Respuesta parcial=1 Respuesta completa=2
<b>Recurrencia</b>	Reaparición de una enfermedad en el mismo paciente. Tumor maligno que ha regresado después de un periodo de tiempo en el que no era posible detectarlo, al mismo sitio anatómico o sitio distante	Reaparición de una enfermedad en un mismo paciente. Tumor maligno de la mama que ha regresado después de un periodo de tiempo en el que no era posible detectarlo, al mismo sitio anatómico o sitio distante	Cualitativa nominal	SI=1 No=0
<b>Lugar de recurrencia</b>	Sitio corporal en el que se detecta la recurrencia de cáncer	Sitio corporal en el que se detecta la recurrencia de cáncer	Cualitativa nominal	1=Local 2=Sistémica
<b>Tiempo de seguimiento</b>	Tiempo de control de la salud de un paciente durante el tiempo después de tratamiento	Tiempo de control de la salud de un paciente durante el tiempo después de tratamiento para cáncer de mama	Cuantitativa continua	Meses

<b>Estado de vida al momento de efectuar el seguimiento</b>	Estado de vida al momento de efectuar el seguimiento	Estado de vida al momento de efectuar el seguimiento	Cualitativa dicotómica	Vivo= 1 Muerto=
<b>Supervivencia</b>	Tiempo que un paciente con cáncer sobrevive después del diagnóstico	Porcentaje de pacientes vivos después de 3 años de seguimiento independientemente de la causa de muerte	Cuantitativa	Porcentaje

**Tabla 1. Variables de estudio.** La variable de tiempo de supervivencia se construyó con base en el tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y la ocurrencia de la muerte. La variable de censura se definió a partir de las mujeres que sobrevivieron durante un periodo de 3 años, y como mecanismo de censura se utilizaron los siguientes criterios: todas las mujeres que permanecieron vivas hasta el final del periodo de estudio y pérdida de seguimiento (cambio de domicilio no notificado, falta de seguimiento del tratamiento y muerte por otra causa diferente del cáncer de mama).

## **CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA**

Se realizó cálculo de tamaño de muestra con la aplicación JavaStat de javastat.stat.wuv.edu para comparación de proporciones y un riesgo mínimo a detectar, con un alfa de 0.05 y un poder del 80%. Se tomó en cuenta el antecedente publicado (74) para el caso de la expresión de GRP78, y su relación con tiempo libre de recurrencia (ya que no hay datos publicados en relación con respuesta patológica o supervivencia global para GRP78), en donde el grupo que sobre-expresó la proteína tuvo una probabilidad de permanecer libre de recurrencia de 0.48 a los 16 meses de seguimiento y el grupo que no expresó GRP78 tuvo una probabilidad de permanecer libre de recurrencia de 0.80 a los 16 meses de seguimiento (Hazard Ratio 1.7) (74)

Se calculó el tamaño de muestra con una probabilidad de permanecer libre de recurrencia de 0.45 en quienes expresen GRP78 y una probabilidad de permanecer libre de recurrencia de 0.72 en quienes no lo expresen, con un riesgo mínimo de detectar Hazard Ratio de 1.5, obteniéndose una n de 74 para cada grupo de comparación (con y sin expresión de GRP78) y con 25% de posibles pérdidas, se requieren 200 pacientes (100 en cada grupo).

## **ALGORITMO DE PROCEDIMIENTOS**

Se incluyeron muestras de tejido tumoral embebido en parafina de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado, resguardadas en el archivo de bloques de tejido embebido en parafina del Servicio de Patología de la UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, IMSS y Servicio de Patología del Hospital de Gineco Obstetricia No. 3, CMN, La Raza, IMSS.

Se utilizó un formato estructurado de recolección de datos diseñado de manera específica para el estudio (*Anexo 3*) y la información se obtuvo de los expedientes clínicos de las pacientes, los cuales se encuentran resguardados en el Archivo de la UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 Luis Castelazo Ayala, IMSS y Archivo del Hospital de Gineco Obstetricia No. 3, CMN, La Raza, IMSS. Todas las pacientes atendidas por sospecha de cáncer de mama en dichos hospitales, cuentan con una historia clínica completa en el expediente, con antecedentes heredofamiliares y personales patológicos detallados.

En el caso de que algunas de las pacientes no tuvieran toda la información necesaria en el expediente debido a que hubieran sido referidas a la UMAE Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS para continuar su manejo y tratamiento, se solicitó autorización para revisar los expedientes correspondientes en el Archivo de la unidad antes mencionada.

El formato de recolección de datos incluyó datos de identificación de las pacientes, características socio-demográficas (edad, origen y lugar de residencia), características del diagnóstico (fecha, estadio clínico basado en la clasificación TNM, características patológicas (tipo histológico, número de ganglios por región con metástasis, tamaño tumoral, grado histológico) (*Anexo 3*).

### **SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO**

Se seleccionaron los bloques de biopsia de tejido embebido en parafina de tejido canceroso mamario previo a recibir tratamiento, de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado. Se determinó el estadio de cáncer de mama (IIB, IIIA, IIIB y IIIC) con base en la estadificación patológica.

Para la selección de los bloques primero se revisaron las laminillas correspondientes al número de registro que maneja el Servicio de Patología, y se ubicó el bloque de tejido embebido en parafina correspondiente.

Una vez que se seleccionaron tanto la laminilla como el bloque de tejido embebido en parafina, se solicitó autorización al Jefe del Servicio de Patología del respectivo hospital por escrito, para utilizar esas muestras con fines del estudio. Cuando se autorizó el permiso, los bloques y laminillas fueron transportados al laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, UMAE Hospital de Oncología, CMN SXXI.

### **CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLOS DE TEJIDO**

Se revisaron las secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) para seleccionar áreas de tejido representativas de tumor. Se construyeron microarreglos de tejidos con el microarreglador de tejidos ATA 100 de CHEMICON, realizando perforaciones en los bloques de parafina de 1 mm de diámetro que fueron colocadas en un bloque aceptor en una matriz determinada. Por cada bloque se colocaron muestras por triplicado o duplicado, dependiendo de la cantidad de tejido disponible; adicionalmente se colocaron tejidos control. Una vez construido el microarreglo, se cubrió con paraplast a 60°C y se incubó en horno a 60°C por 10 minutos. Posteriormente se realizaron cortes de 4 µm en el microarreglo y se colocaron en laminillas electrocargadas, como se describe en el *Anexo 4*.

### **INMUNOHISTOQUÍMICA (*Anexo 4*)**

Para la identificación de la expresión de ER $\alpha$ , PR y HER2/NEU se utilizaron anticuerpos VENTANA Breast Markers (*Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona, USA*); para identificar las proteínas ER $\beta$ , BIK, BECN1 y GRP78, se utilizaron anticuerpos específicos: anticuerpo anti-ER $\beta$  ab3576, anticuerpo anti-Bik ab54862, anticuerpo anti-Beclin-1 ab51031,

anticuerpo anti-GRP78 BiP ab21685, de la marca abcam (abcam plc, UK). La identificación de marcadores se realizó con el sistema automatizado Benchmark Autostainer (*Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona, USA*) y el sistema de detección *ultraViewDab* (*Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, Arizona, USA*), basado en multímero–peroxidasa de rábano-DAB. El control negativo fue una muestra en la cual el anticuerpo primario se omitió. Se incluyeron como controles positivos para BIK tejidos de apéndice, testículo y riñón (expresión mediana), cerebelo y pulmón (expresión baja); para GRP78 se incluyeron como controles positivos tejidos de cerebelo y testículo (expresión alta), pulmón, hígado, riñón, apéndice y próstata (expresión mediana) y cervix (expresión baja); para BECN1 se consideraron como positivos tejidos de cerebelo, apéndice, pulmón, riñón y testículo (expresión mediana) e hígado, próstata y cervix (expresión baja). La tinción inmunohistoquímica de las laminillas fue revisada por dos patólogos los cuales estuvieron cegados a los datos clínicos. Para evaluar ER $\alpha$ , PR y HER2/NEU, se siguieron las recomendaciones de la ASCO (94,95). Para la evaluación de los otros marcadores, la tinción fue graduada por intensidad de la tinción (1, débil; 2, moderada; 3 intensa) y por porcentaje de células teñidas (1, 0 a <10%; 2, 10 a <50%; 3, 50 a 100%). El índice total de expresión de cada proteína se determinó basado en las dos variables previas: positivo cuando ambas puntuaciones fueron  $\geq 2$  y negativo cualquier otra puntuación.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó análisis descriptivo en el que se obtuvieron frecuencias y porcentajes para las variables nominales y medidas de tendencia central y dispersión para las variables numéricas. Se evaluaron asociaciones entre características socio-demográficas, características del diagnóstico, tratamiento, características patológicas, características de los receptores y expresión a nivel proteína de BIK, BECN1 y GRP78, usando tablas de contingencia y chi cuadrada de Pearson o prueba exacta de Fisher así como correlación de Pearson.

La asociación de tiempo a la muerte y expresión de BIK, BECN1 y GRP78 se realizó mediante la técnica de Kaplan-Meier. La supervivencia se determinó a los 3 años para cada variable. En el análisis estratificado se utilizó la prueba de log Rank para evaluar las diferencias entre las curvas de supervivencia. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 22.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudio cumple con los aspectos éticos de investigación en seres humanos de acuerdo a los principios de Helsinki, así como del Reglamento de la Ley General en Salud en materia de Investigación para la Salud, Título segundo, Capítulo I, artículo 17. Se clasifica como una investigación sin riesgo dado que se efectuó revisión de bloques de parafina de archivo que contienen tejido procedente de la biopsia realizada a las pacientes como parte del procedimiento habitual en el diagnóstico patológico de cáncer de mama, además de la revisión de sus respectivos expedientes clínicos. El protocolo fue aprobado para su realización por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Ética con el Número: 2013-785-036.

Para proteger la confidencialidad, se asignó un número progresivo a cada una de las muestras de biopsia en tejido mamario, sin dar a conocer datos de identificación a los técnicos patólogos que realizaron la inmunohistoquímica. El nombre de los pacientes se abrevió por la primera letra del nombre y apellidos, y se acompañó del número que fue asignado a la biopsia de tejido mamario correspondiente, para ser ingresado a la base de datos.



#### IV. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 109 bloques de tejido embebido en parafina de pacientes con cáncer de mama en estadio localmente avanzado que cumplieron los criterios de inclusión, de los cuales 52 (39.4%) proceden del Departamento de Patología, HGO No. 3, CMN La Raza, IMSS y 57 (43.2%) proceden del Departamento de Patología, UMAE HGO No. 4 "Luis Castelazo Ayala", IMSS.

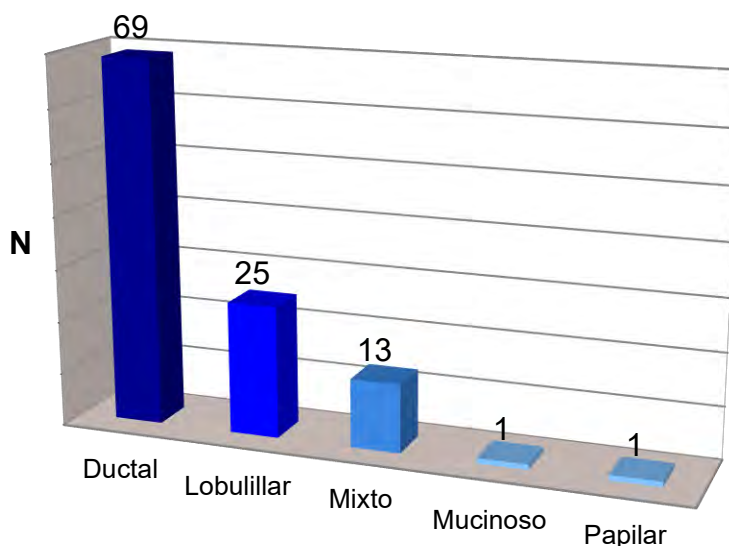
El promedio de edad de las pacientes fue de  $57.3 \pm 13.2$  años. En cuanto a antecedentes personales patológicos, 39 (35.8%) tenían hipertensión arterial sistémica y 19 (17.4%) tenían diabetes mellitus. De las 109 pacientes, 7 (6.4%) habían tenido alguna otra neoplasia además del cáncer de mama; en 33 pacientes (30.3%) había antecedentes heredofamiliares de algún tipo de cáncer.

En cuanto a los antecedentes gineco obstétricos, la edad de la menarca fue reportada en 77 pacientes (70.6%) con un promedio de  $12.83 \pm 1.66$  años. En cuanto al número de gestaciones, 9 pacientes (8.25%) fueron reportadas nuligestas, 76 (69.72%) con una a 11 gestaciones y 24 (22.01%) no se reportaron en el expediente. La edad de la primera gestación fue reportada en 64 pacientes (58.71%) con un promedio de  $22.23 \pm 5.03$  años. El 73.4% (80 pacientes) ya habían presentado menopausia y sólo 6 (5.5%) habían usado hormonales en algún momento de su vida.

Respecto a las características clínicas relacionadas con el cáncer de mama, se encontró que las clasificaciones T3 y T4 (73.39%) así como N1 y N2 (80.73%) fueron los más frecuentes. En 16 casos (14.7%) el tumor no fue palpable, mientras que el tamaño tumoral máximo reportado fue de 15.3 cm, con un promedio de  $3.65 \pm 3.23$  cm. En cuanto a la clasificación de riesgo por tamaño tumoral, 91 pacientes (83.5%) presentaron tumores menores de 6 cm y 18 pacientes (16.5%) presentaron tumores mayores de 6.1 cm.

De acuerdo a la clasificación TNM, el estadio más frecuente fue el estadio IIIA (44%) y IIIB (36.7%). Al realizar gammagrafía ósea se reportó sospecha de invasión metastásica en 4 pacientes (3.66%) y al realizar USG hepático 1 paciente fue reportada como positiva para metástasis.

En relación al reporte histopatológico, 69 pacientes (63.3%) tuvieron tipo histológico correspondiente a carcinoma ductal, 25 (22.9%) tuvieron carcinoma lobulillar, 13 (11.9%) tuvieron un carcinoma mixto; sólo hubo un caso de carcinoma de tipo mucinoso y otro de papilar (*Figura 1*). El grado histológico más frecuente fue el III, en el 45.8% de las muestras.



**Figura 1. Tipo histológico de cáncer de mama.** Frecuencia absoluta del tipo histológico de cáncer de mama encontrados en las muestras de tejido de las pacientes incluidas en el estudio.

El promedio de ganglios reportados como positivos a metástasis fue de  $4.47 \pm 5.65$ , con un máximo de 36 ganglios. En cuanto a la clasificación de riesgo por número de ganglios metastásicos, 63 pacientes (57.8%) presentaron menos de 3 ganglios y 46 pacientes (42.2%) presentaron 4 o más ganglios metastásicos.

De las 109 pacientes, 63 (57.7%) recibieron QT neoadyuvante como parte de su manejo;

siendo el esquema secuencial el tratamiento más utilizado (63.4% de las pacientes).

La respuesta clínica se reportó en 62 de las pacientes que recibieron neoadyuvancia, de las cuales en el 61.29% fue reportada como parcial, en el 19.35% como completa, en el 12.9% con estatismo, en el 3.22% con respuesta parcial con afectación ganglionar y en el 3.22% con progresión.

La respuesta patológica se reportó en 62 de las pacientes que recibieron neoadyuvancia, de las cuales en el 61.29% fue reportada como parcial, en el 29.03% como completa, en el 1.61% con estatismo y en el 3.22% con progresión.

Con respecto a la supervivencia a 3 años, 67 (69.7%) de las pacientes permaneció con vida; ninguna tuvo falta de seguimiento al tratamiento, y ninguna falleció por otra causa diferente al cáncer de mama. De las 109 pacientes, 15 (13.8%) tuvo recidiva local; mientras que 26 (23.8%) tuvo recidiva sistémica, siendo más frecuente las metástasis óseas en el 23% de los casos.

Con los 109 bloques de tejido tumoral mamario embebido en parafina, se contruyeron 6 microarreglos de tejido para posteriormente ser analizados por inmunohistoquímica.

Número de microarreglo	Número de muestras
EUN-1	22
EUN-2	18
EUN-3	31
EUN-4	28
EUN-5	31
EUN-6	34

**Tabla 2. Microarreglos de tejido contruidos y número de muestras.** En esta tabla se observa el número de muestras contenidas en cada microarreglo. Los microarreglos 1 y 2 corresponden a muestras únicamente de la UMAE HGO No.4 y los microarreglos 3 y 4 a muestras únicamente de la HGO No. 3 La Raza. En el microarreglo 5 se incluyeron muestras que se tuvieron que repetir por haberse desprendido durante su procesamiento (elaboración de las laminillas electrocargadas con corte de 4µm y realización de inmunohistoquímica), al igual que algunas muestras del microarreglo 6.

A continuación se presenta la localización de cada muestra en el microarreglo, junto con sus duplicados o triplicados, y los tejidos control utilizados.

**Tabla 3. Microarreglo 1**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	B11 076-7	B10 13930-7	B11 5664-3	B11 3736-16	B11 2445-3	B11 5988-4	B11 5788-4	B11 320	Control apéndice
2	B11 076-7	B10 13930-7	B11 5664-3	B11 3736-16	B11 2445-3	B11 5988-4	B11 5788-4	B11 320	Control riñón
3	B11 076-14	Control apéndice	B11 6669-1	B11 6496-7	B11 5076-1	B10 14484-6	Control riñón	B11 3838	
4	B11 076-14	Control apéndice	B11-6669-1	B11 6496-7	B11 5076-1	B10 14484-6	Control riñón	B11 3838	
5	B11 4428-5	B10 13470-15	B11 175-7	B11 6088-2	B11 4531-7	B11 4430-8	B11 071-4	B11 4076-1	
6	B11 4428-5	B10 13470-15	B11 175-7	B11 6088-2	B11 4531-7	B11 4430-8	B11 071-4	B11 4076-1	
7	B10 14276-3	B10 14276-3	B11 175-15	B11 175-15					

**Tabla 4. Microarreglo 2**

	A	B	C	D	E	F	G
1	B12 1222-6	B12 7118-11	Control riñón	B12 3718-5	B12 2087-2	Control pulmón	B12-6869-6
2	B12 1222-6	B12 7118-11	Control riñón	B12 3718-5	B12 2087-2	Control pulmón	B12 6869-6
3	B12 1284-5	B12 1266-3	B12 879-4	B11 11105-2	B11 4368-4	B12 3466-6	B11 12089-5
4	B12 1284-5	B12 1266-3	B12 879-4	B11 11105-2	B11 4368-4	B12 3466-6	B11 12089-5
5	B12 2283-1	B12 9123-3	B12 6250-12	B12 1373-2	Control cérvix	B12 582-10	Control hígado
6	B12 2283-1	B12 9123-3	B12 6250-12	B12 1373-2	Control cérvix	B12 582-10	Control hígado
7	B11 1096-4	B11 1096-4					

**Tabla 5. Microarreglo 3**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	4640-11-2	B5531-2-12	B5531-2-12	B6699-12-4	556-12-4	B6368-12-2	B6368-12-2	B933-12	B4460-12	
2	46-4011-2	B5531-2-12	B3683-13-2	B6699-12-4	556-12-4	5527-12-2	B6368-12-2	B2374-12	Blanco	
3	46-4011-2	B4565-11-6	B3683-13-2	B6699-12-4	B1305-12-1	5527-12-2	B2112-12	5519-12-3	B6591-13-1	
4	B3450-12-6	B4565-11-6	B1869-11-4	B4342-11-4	B1305-12-1	5527-12-2	Control riñón	5519-12-3	B6591-13-1	Control cérvix
5	B3450-12-6	B7326-12	B1869-11-4	B4342-11-4	B944-12-6	B6369-12-2	Control testículo	B5152-12-2	B6591-13-1	Control cerebelo
6	B3450-12-6	B7326-12	B1869-11-4	B2850-11-12	B944-12-6	B6369-12-2	Control cerebelo	B5152-12-2	B6879-13-2	401-12
7	B3450-12-12	B6088-13-5	B6370-11-6	B2850-11-12	4832-12-2	B6369-12-2	B7417-12	B7417-12	B6879-13-2	401-12
8	B3450-12-12	B6088-13-5	B6370-11-6	B2850-11-12	4832-12-2					

**Tabla 6. Microarreglo 4**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	B5034-10	3070-10	3070-10	391-11	391-11	642-10	B12-4027	B6316-11	B6316-11	B3181-13-5	Control riñón
2	B5034-10	B7734-12-3	851-11	391-11	632-11	642-10	B12-4027	883-11	Control riñón	B3181-13-5	B7242-11-10
3	B6743-11	B7734-12-3	851-11	1071-10	632-11	642-10	B12-4027	883-11	Control cerebelo	1044-11	B7242-11-10
4	B6743-11	B4899-11-5	B632-11	1071-10	632-11	877-12-3	B5705-11-1	7421-11-1	5124-11-5	1044-11	Control pulmón
5	299-09	B4899-11-5	B632-11	651-11	B3287-10	877-12-3	B5914-11	7421-11-1	5124-11-5	1044-11	
6	299-09	5989-10	B5986-1	651-11	B3287-10	877-12-3	B5914-11	7421-11-1	2849-11-7	2849-11-7	
7	5989-10	5989-10	B5986-1	651-11							

**Tabla 7. Microarreglo 5**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	B5034-10	B632-11	651-11	877-12-3	642-10	B6316-11	5124-11-5		B6088-13-5	B6088-13-5	14608 A	14727	071-4	3718-5
2	B6743-11	B632-11	651-11	877-12-3	642-10	B6316-11	5124-11-5		B933-12	5519-12	14608 A	14747	071-4	3718-5
3	299-09	851-11	B5988-1	B3287-10	B12-4027	883-11	2849-11-7		B4460-12	5519-2	14608 A	14920	175-15	
4	299-09	851-11	1071-10	B3287-10	B12-4027	883-11	2849-11-7		B2374-12	B3683-13-2	14466 A	14920	175-15	
5	5989-10	3070-10	391-11	Cerebelo	B5705-11-1	B7421-11-1	1044-11		B2112-12	B3683-13-2	14466 A	14954	4531-7	
6	5989-10	3070-10	391-11	Testículo	B5705-11-1	B7421-11-1	1044-11		401-12	B1111105-2	13821 A	14954	4531-7	
7	B4899-11-15	B7734-12-3	632-11	Pulmón	B5914-11-11	B5914-11-11	B3181-13-5		401-12	B1111105-2	13821 A	15937	B11320	
8	B4899-11-5	B7734-12-3					B3181-13-5		B4565-11-6	B1112089-5	B1311634	15937	B11320	
9							B7242-11-10		B4565-11-6	B1112089-5	B1311634	5792	5792	

**Tabla 8. Microarreglo 6**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	7901-13	559-11	3755-7	5232	5232	1305-12	1305-12	3450-12	Apéndice
2	7901-13	559-11	3755-7	5583-3	7420-11	7417-2	5531-12	3450-12	Apéndice
3	B13-2429-5	5763-1		5583-3	7420-11	7417-2	5531-12	4460-12	5152-12
4	B13-2429-5	5763-1	801-14	4219	6463	2374-12	Testículo	4460-12	5152-12
5	B13-2736-6	2083-2	801-14	4219	6463	2374-12	Cerebelo	933-12	Próstata
6	B13-2736-6	2083-2	977-3	4873-7	6570-5	944-12	Pulmón	933-12	Próstata
7	7474	4902-5	977-3	4873-7	6570-5	556-12-4	6699-12-4	2112-12	
8	7474	4902-5	2636-5	2636-5		556-12-4	6699-12-4	2112-12	

**Tablas 3-8. Microarreglos de tejido y distribución de muestras.** En las tablas 3 a 8 se presentan los seis microarreglos de tejidos construidos, con la distribución de cada una de las muestras dentro del microarreglo. Cada muestra ocupa un lugar o spot; ejemplo: muestra 7901-13 en el microarreglo 6, localizada en el spot A1.

Se realizó el cálculo de diluciones de los anticuerpos para cada proteína, quedando de la siguiente manera:

**Tabla 9. Anticuerpos, concentración del anticuerpo y dilución de trabajo.**

Anticuerpo	Concentración stock	Dilución
ER $\beta$	100 microgramos (1mg/ml)	1/50
GRP78	100 microgramos (1mg/ml)	1 $\mu$ g/ml
BIK	100 microgramos (1mg/ml)	3 $\mu$ g/ml
BECN1	0.05 ng/ml	1/50

Una vez hechas alícuotas de cada anticuerpo, se inició a probar distintas diluciones en tejidos control hasta obtener la dilución adecuada para observar un buen contraste en la tinción de inmunohistoquímica.

**Tabla 10. Diluciones durante el proceso de estandarización y pretratamiento utilizado.**

	Dilución al inicio de estandarización	Dilución final	Pretratamiento	Tiempo
BECN1	1:100	1:100	CC1	30 minutos
GRP78	1:500	1:500	CC1	30 minutos
ER $\beta$	1:100	1:250	CC1	30 minutos
BIK	1:400	1:250	CC1	30 minutos
HER2	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos
PR	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos
ER $\alpha$	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos

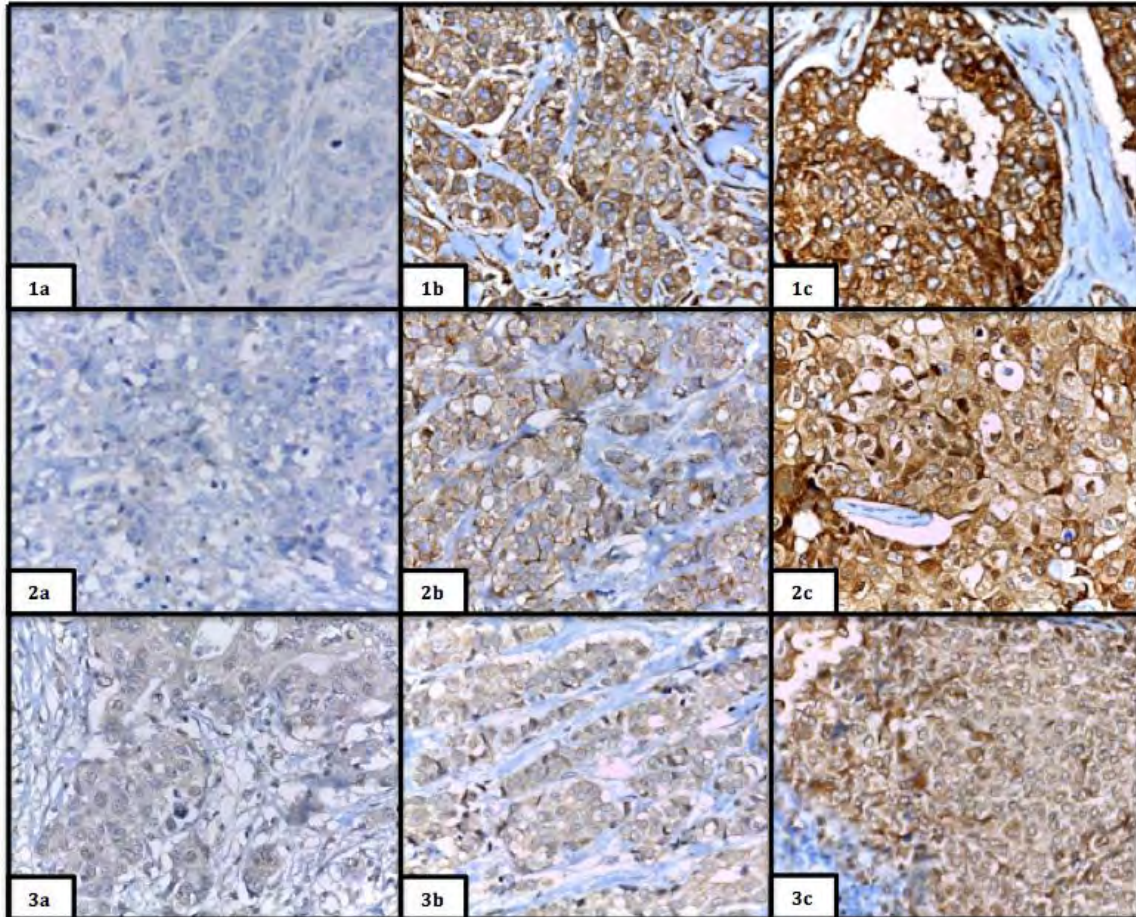
*CC1: Solución de acondicionamiento celular 1 (pretratamiento)*

Una vez estandarizada la dilución de cada anticuerpo, se procedió a realizar las inmunohistoquímicas en las muestras de tejido tumoral de las pacientes, encontrando los siguientes resultados:

En cuanto a los biomarcadores de uso clínico para cáncer de mama, HER2 resultó positivo en 15.5% de las muestras tumorales; ER $\alpha$  fue positivo en 63.3% de las muestras y el receptor de progesterona, en 48.3%. ER $\beta$  se expresó en el núcleo en 44.2% de las muestras y a nivel

citoplásmico en 67.4% de las muestras.

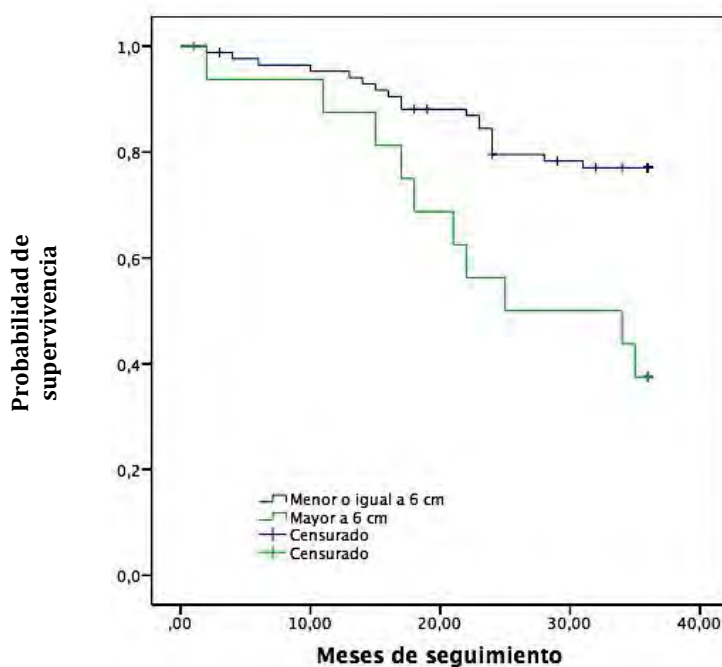
En relación a los biomarcadores propuestos, BIK resultó positivo en 80.8% de las muestras tumorales; GRP78 se expresó en 76.7% de las muestras, mientras que BECN1 en 60.7% de las muestras (*Figura 2*).



**Figura 2. Imágenes de inmunohistoquímica de GRP78, BECN1 y BIK (400x).** En la imagen 1a se observa tinción débil (1) de GRP78 a nivel de citoplasma en >10% de las células, resultado negativo; en 1b se observa tinción moderada (2) de GRP78 en >10% de las células, resultado positivo; en 1c se observa tinción intensa (3) en >10% de las células, resultado positivo. En la imagen 2a se observa tinción débil en citoplasma(1) de BECN1 en >10% de las células, resultado negativo; en 2b se observa tinción moderada en membrana y citoplasma (2) de BECN1 y en 2c tinción intensa en citoplasma (3), ambas en >10% de las células, correspondiendo a resultado positivo. En la imagen 3a se observa tinción débil (1) de BIK en citoplasma, resultado negativo; en 3b y 3c tinción moderada e intensa, respectivamente, en >10% de las células correspondiendo a resultado positivo.

Se realizó análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier de acuerdo a los factores

de pronóstico de uso clínico reportados hasta la fecha. Al evaluar la supervivencia en función del tamaño tumoral, se observó una media de seguimiento estimada para el grupo de 86 mujeres con tumores  $\leq 6$  cm de 31.84 meses (IC 95% 30.018-33.66) con 19 muertes durante el seguimiento y para el grupo de 17 mujeres con tumores  $>6$  cm de 26 meses (IC 95% 20.725-31.275) con 10 muertes durante el seguimiento. Al realizar prueba de Log Rank se obtuvo un valor de  $X^2$  de Pearson de 11.189 con una  $p=0.001$  (Figura 3).

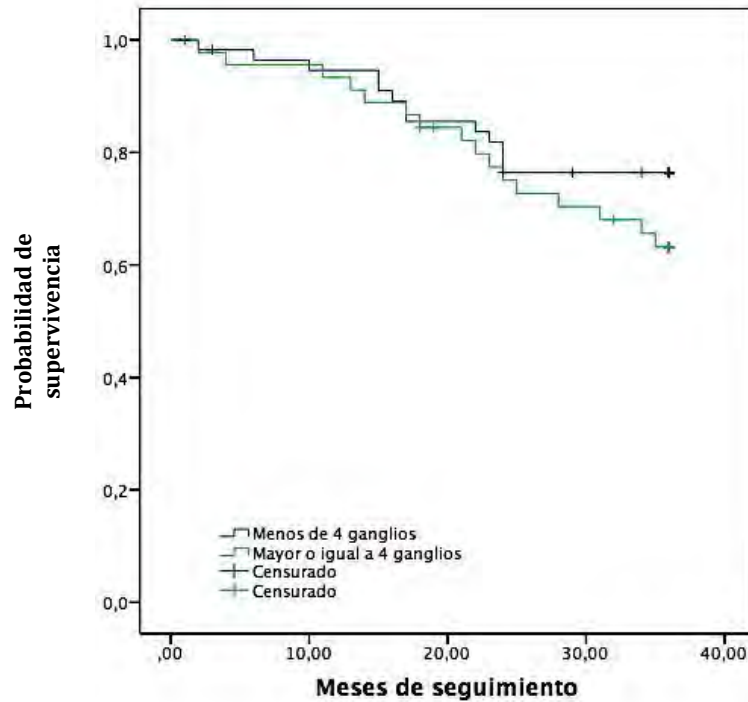


**Figura 3. Supervivencia a 3 años en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado en relación al tamaño tumoral.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier, en la cual se observa que el tamaño tumoral mayor de 6 cm se asoció con menor supervivencia ( $p=0.001$ ) a 3 años (36 meses) en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado.

Al evaluar la supervivencia en función del número de ganglios metástasicos, se observó una media de seguimiento estimada para el grupo de 58 mujeres con  $<4$  ganglios de 31.41 meses (IC 95% 29.079-33.76) con 13 muertes durante el seguimiento y para el grupo de 45

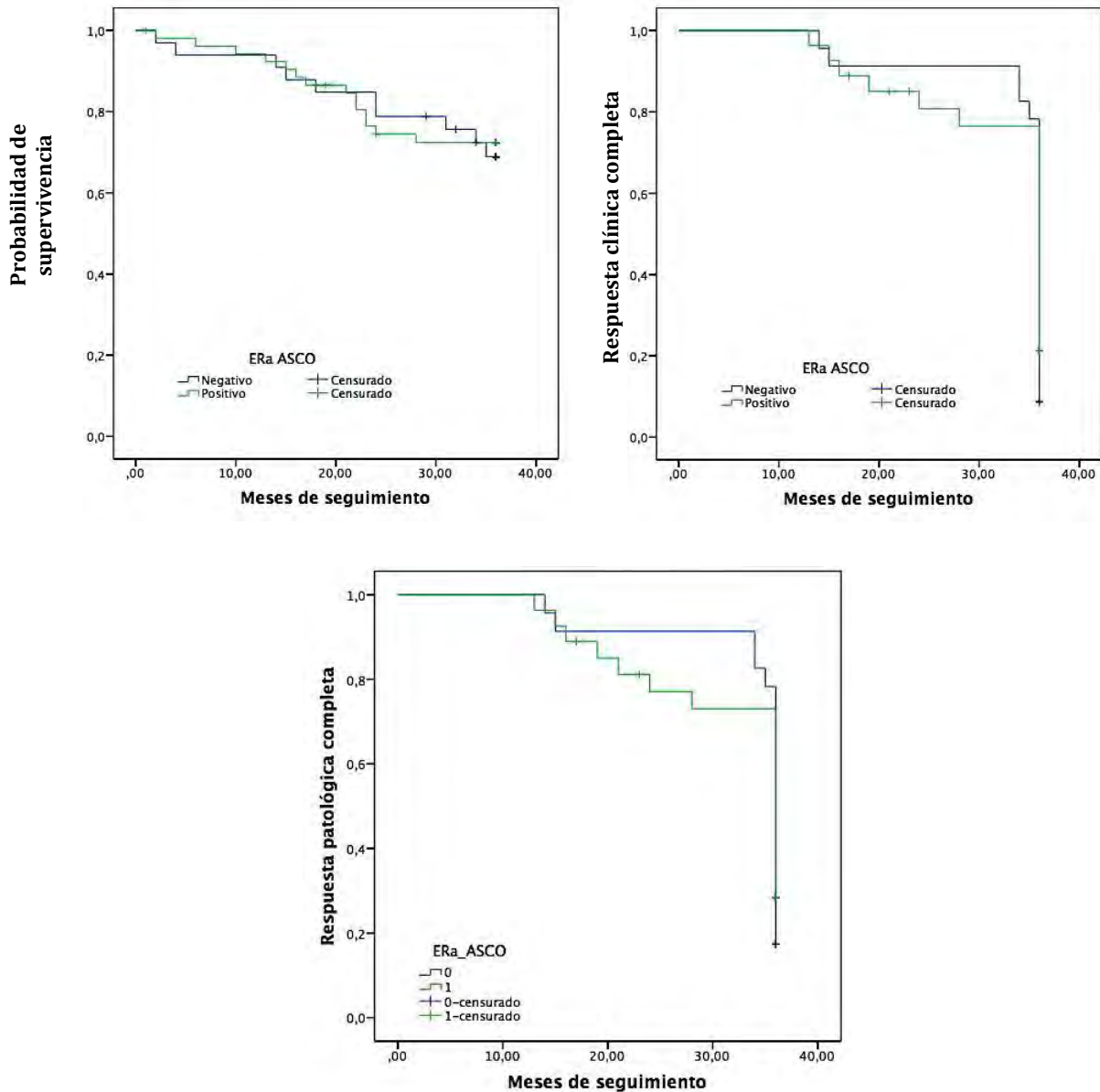


mujeres con  $\geq 4$  ganglios de 30.25 meses (IC 95% 27.476-33.030) con 16 muertes durante el seguimiento. Al realizar prueba de Log Rank se obtuvo un valor de  $X^2$  de Pearson de 1.615 con una  $p=0.204$  (Figura 4).



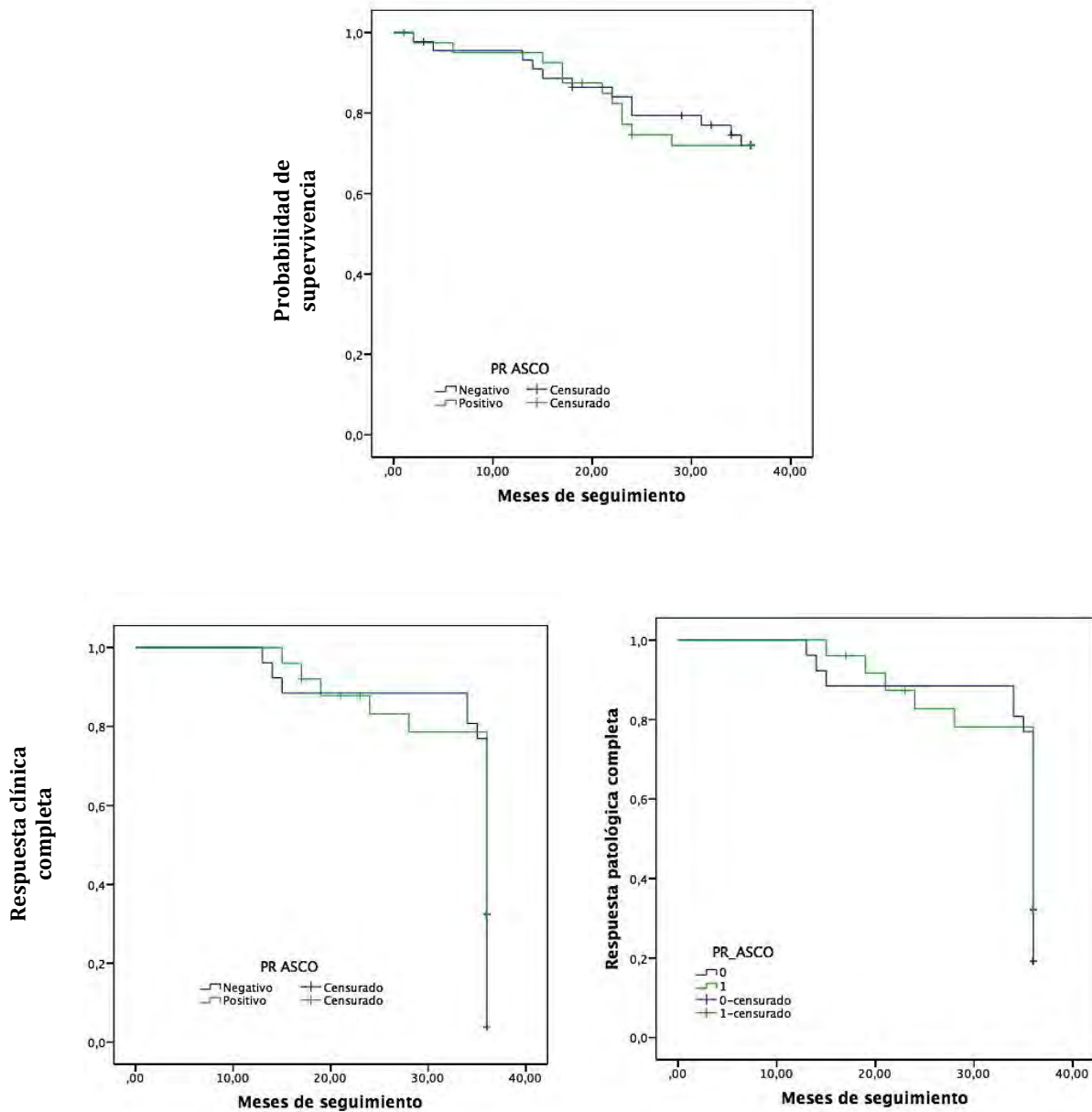
**Figura 4. Supervivencia a 3 años en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado en relación al número de ganglios metastásicos.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier, en la cual se observa que la presencia de 4 o más ganglios metastásicos se asocia a menor supervivencia a 3 años (36 meses) en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado.

Al evaluar la supervivencia, respuesta clínica y patológica en función de la expresión de los ER $\alpha$  de acuerdo a la escala de la ASCO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.844$ ,  $p=0.592$ ,  $p=0.786$  respectivamente) (Figura 5).



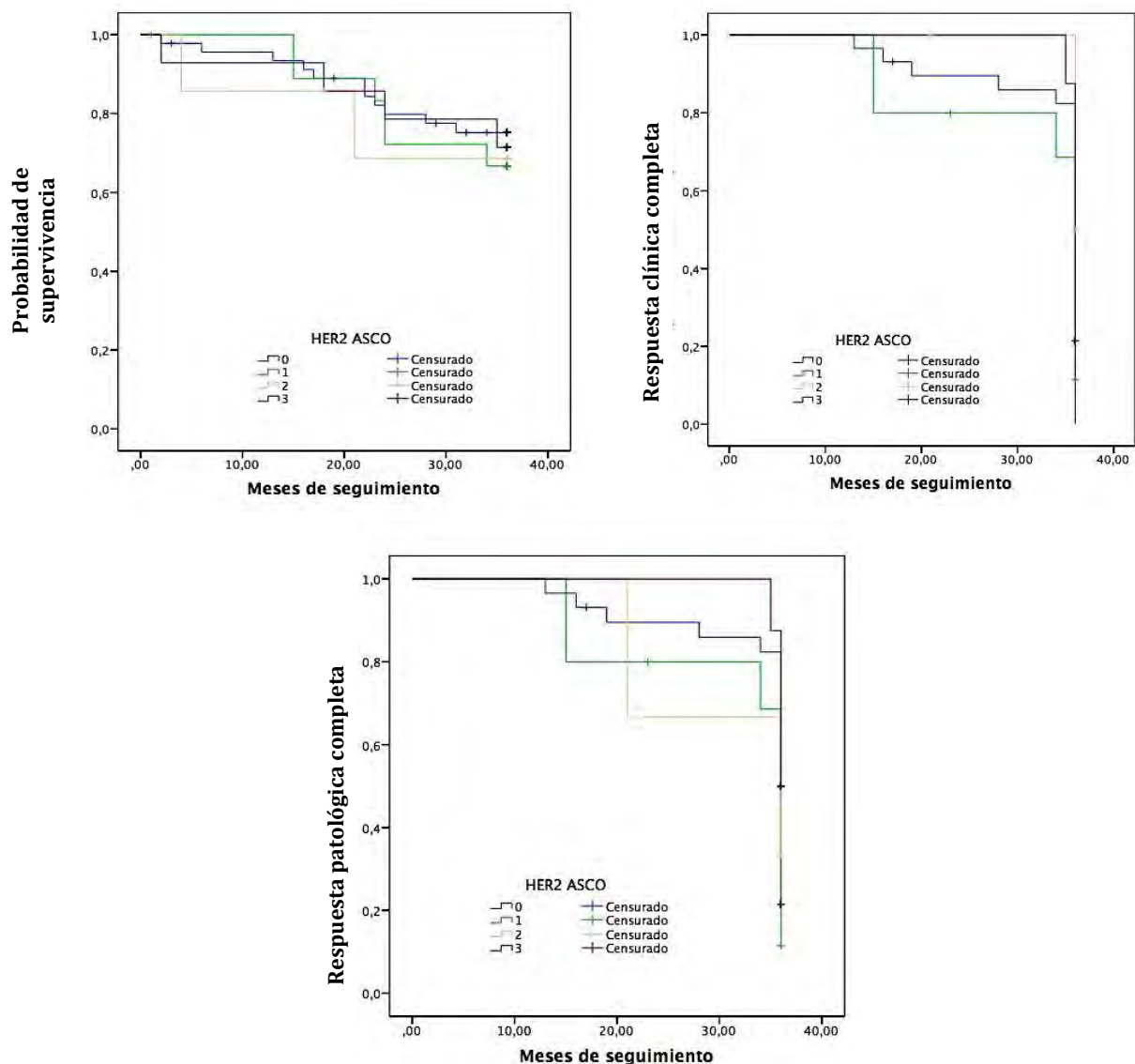
**Figura 5. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años (36 meses), respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de los ER $\alpha$  (Escala ASCO) en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado. En las curvas se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tiempo de supervivencia entre las que expresaron ER $\alpha$  en el tejido tumoral y las que no lo expresaron.**

Al evaluar la supervivencia, respuesta clínica y patológica en función de la expresión de los PR de acuerdo a la escala de la ASCO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.950$ ,  $p=0.090$  y  $p=0.450$  respectivamente) (Figura 6).



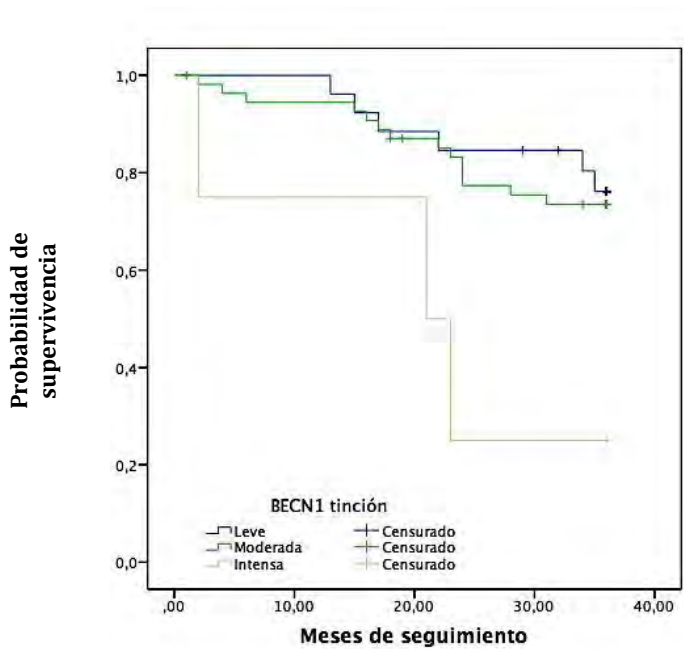
**Figura 6. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años (36 meses), respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de los PR (Escala ASCO) en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado. En las curvas se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tiempo de supervivencia entre las que expresaron PR en el tejido tumoral y las que no lo expresaron.**

Al evaluar la supervivencia, respuesta clínica y patológica en función de la expresión de los HER2/NEU de acuerdo a la escala de la ASCO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.932$ ,  $p=0.406$  y  $p=0.328$  respectivamente) (Figura 7).



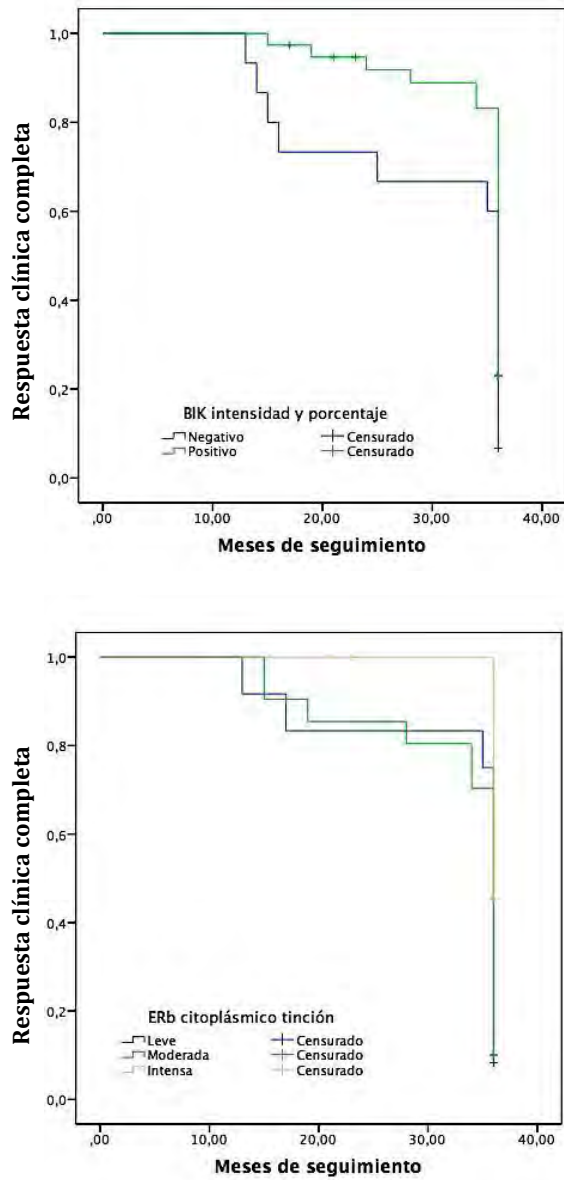
**Figura 7. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años (36 meses), respuesta clínica completa y respuesta patológica completa en relación a la expresión de los HER2/NEU (Escala ASCO) en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado. En las curvas se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tiempo de supervivencia entre las que expresaron HER2 en el tejido tumoral y las que no lo expresaron.**

En el análisis de supervivencia, se observó que las pacientes cuyas muestras tumorales tuvieron una tinción intensa de BECN1 tuvieron una supervivencia promedio de 20.5 meses comparado con 32.9 y 31.3 meses en quienes tuvieron tinción débil y moderada, respectivamente ( $p=0.020$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia a 3 años (36 meses) en relación a la intensidad de tinción de BECN1.** La tinción intensa de BECN1 se asoció con menor supervivencia (20.5 meses), comparado con 32.9 y 31.3 meses para las tinciones débil y moderada, respectivamente ( $p=0.020$ ).

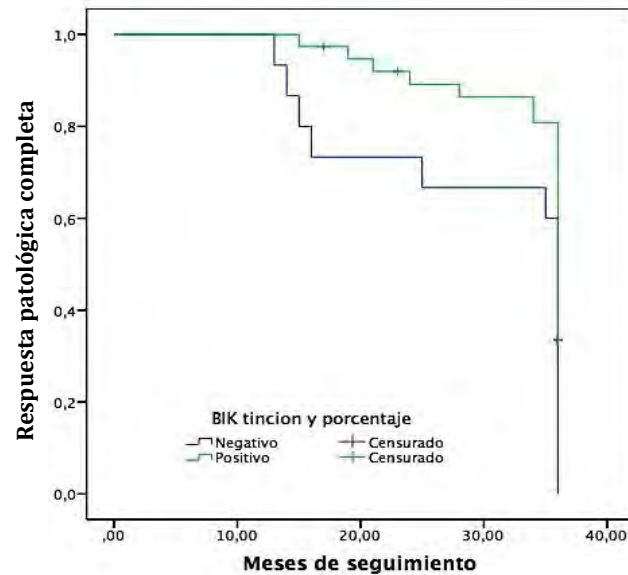
En relación a la respuesta clínica, se encontró un mayor porcentaje de respuesta clínica completa en quienes expresaban BIK en el tejido tumoral comparado con quienes no lo expresaban ( $p=0.029$ ); también se encontró un mayor porcentaje de respuesta clínica completa en aquellas muestras de tejido tumoral con tinción citoplásmica intensa de ER $\beta$  ( $p=0.018$ ) (Figura 9).



**Figura 9. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la respuesta clínica completa a 3 años (36 meses) en relación a la expresión de BIK y ERβ citoplásmico. a)** La expresión de BIK se asoció con mayor frecuencia de respuesta clínica completa (28.9% comparado con 6.7% en el grupo que no lo expresaba). **b)** La expresión intensa de ERβ citoplásmico se asoció con mayor frecuencia de respuesta clínica completa (53.8% comparado con 14.3% en el grupo de expresión moderada y 8.3% en el grupo de expresión leve).

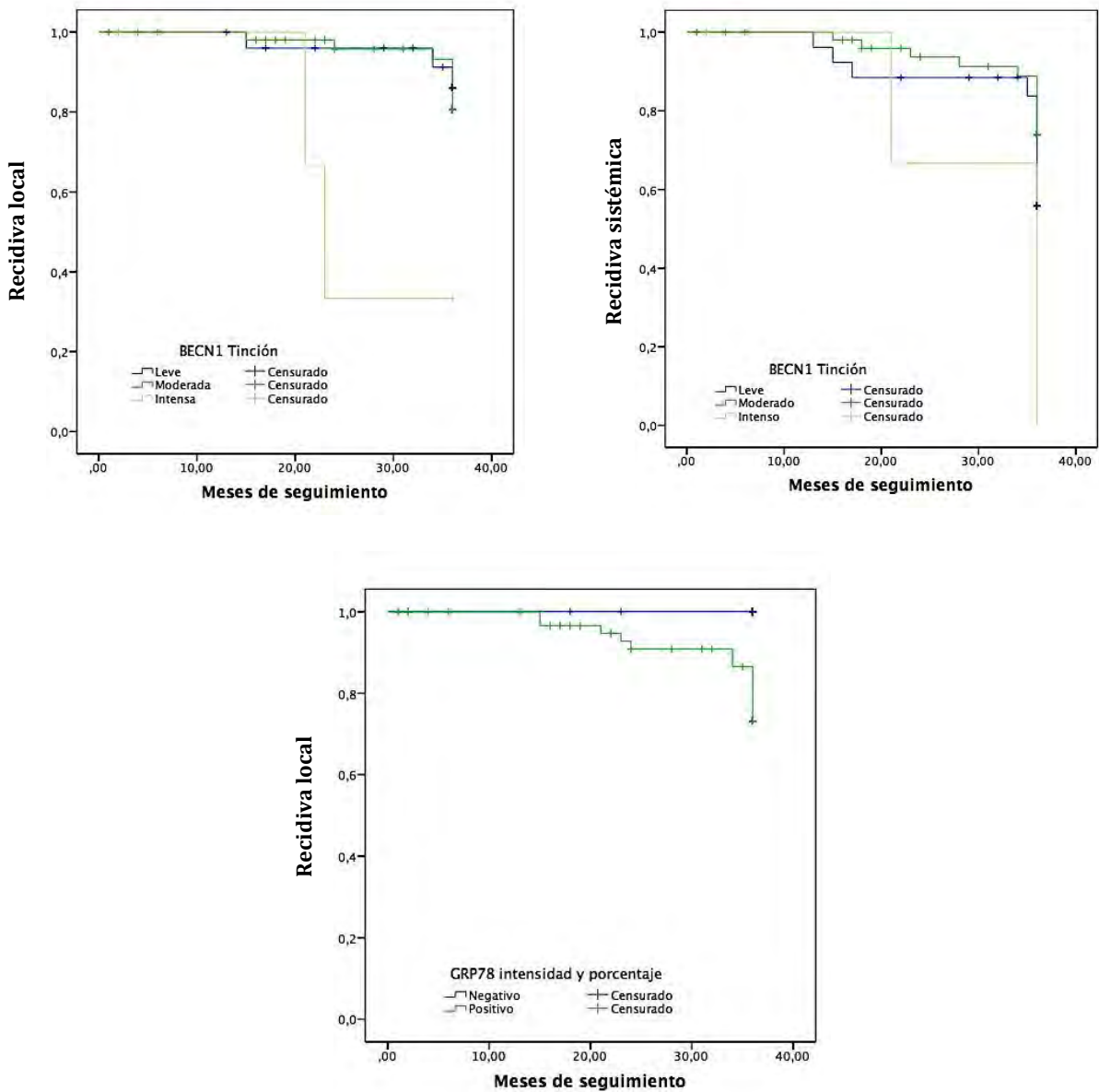
En cuanto a la respuesta patológica, la expresión de BIK se asoció con mayor frecuencia de

respuesta patológica completa ( $p=0.005$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la respuesta patológica completa a 3 años (36 meses) en relación a la expresión de BIK.** La expresión de BIK en las muestras de tejido tumoral de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado, se asoció con mayor frecuencia de respuesta patológica completa (36.8% comparado con 0% en el grupo que no lo expresaba).

La tinción intensa de BECN1 se asoció con mayor frecuencia de recidiva local y sistémica ( $p=0.006$  y  $p=0.044$ , respectivamente), mientras que la expresión de GRP78 se asoció con mayor frecuencia de recidiva local ( $p=0.024$ ) (Figura 11).



**Figura 11. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la recidiva local y sistémica a 3 años (36 meses) en relación a BECN1 y GRP78.** a) La intensidad de tinción de BECN1, donde la tinción intensa se asoció con mayor frecuencia de recidiva local (50% en comparación con 14.5% en el grupo de tinción moderada y 11.5% en el grupo de tinción leve); b) la intensidad de tinción de BECN1, donde la tinción intensa se asoció con mayor frecuencia de recidiva local (50% en comparación con 20.4% en el grupo de tinción moderada y 38.5% en el grupo de tinción leve); c) la expresión de GRP78, donde un resultado positivo para GRP78 se asoció con mayor frecuencia de recidiva local (79.4% en comparación con 0% en el grupo sin expresión).



## V. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una entidad heterogénea que en la actualidad representa un problema de salud pública a nivel mundial y en México, debido a un aumento en su incidencia y en la tasa de mortalidad (1,2). Por lo que, se ha efectuado mayor énfasis en los programas de escrutinio; sin embargo a pesar de estas estrategias, un alto porcentaje de tumores mamarios se diagnostica en etapas localmente avanzadas (30-40%). Lo anterior repercute directamente en la supervivencia de las pacientes, ya que el estadio clínico en el que se efectúa el diagnóstico y se otorga el tratamiento para cáncer de mama, se asocia con la supervivencia global en las pacientes (5-7). De las 109 muestras en nuestro estudio, se observó que el tamaño tumoral mayor de 6 cm puede ser considerado un factor de mal pronóstico (menor supervivencia) en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, un dato similar al reportado en otros estudios (21,22). Sin embargo, no encontramos asociación entre marcadores de pronóstico de uso clínico en la actualidad (número de ganglios metastásicos, ER $\alpha$ , PR y HER2/NEU) con la supervivencia, respuesta clínica y/o respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante.

En relación a GRP78, era de esperar que un incremento en su expresión se asociara con mal pronóstico, como ha sido reportado por Lee y colaboradores (74,75) y probablemente con resistencia a tratamiento quimioterapéutico y hormonal (103-107). En nuestro estudio no encontramos asociación de la expresión de GRP78 con la supervivencia, respuesta clínica, respuesta patológica o recidiva sistémica, sin embargo si se observó una asociación estadísticamente significativa entre su expresión y mayor frecuencia de recidiva local, incluso en 79.4% al compararla con el grupo que no lo expresaba (quienes no presentaron casos de recidiva local durante el seguimiento), lo cual confirma el papel que GRP78 juega en la resistencia a tratamiento en cáncer de mama.

Con respecto a la expresión de BIK en tejido tumoral mamario encontramos asociación estadísticamente significativa con mayor frecuencia de respuesta clínica y patológica

completa posterior al tratamiento quimioterapéutico neoadyuvante, lo cual concuerda con los numerosos reportes que sugieren una función pro-apoptótica tumor supresora de BIK en tejidos específicos (96,97). De hecho, varios estudios han reportado que al exponer células de diferentes tejidos a distintos agentes quimioterapéuticos como Adriamicina, Camptotecina y Cisplatino, hay un aumento en la expresión de BIK (98–100), e incluso varios reportes han ligado la ausencia de expresión de BIK con resistencia a agentes quimioterapéuticos durante el tratamiento (97). Lo anterior puede explicar que las pacientes incluidas en nuestro estudio, al sobre-expresar la proteína BIK en el tejido tumoral, hayan tenido una mejor respuesta tanto clínica como patológica posterior a recibir quimioterapia neoadyuvante.

Sin embargo, a pesar que a nivel de mRNA tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha podido observar este comportamiento de BIK acorde con la función pro-apoptótica que se le ha otorgado, recientemente Pandya y colaboradores reportaron un hallazgo paradójico de la expresión de BIK a nivel proteína (101), ya que a pesar que ellos no estudiaron respuesta clínica y patológica completa, sí reportaron una menor supervivencia global y un menor periodo libre de enfermedad asociado a la sobreexpresión de BIK. Es probable que la discrepancia en estos hallazgos pueda ser explicada por el involucro de variables como el estadio clínico de las pacientes incluidas en el estudio, la edad, estado de menopausia, entre otras. En relación a la variabilidad dada por el estadio clínico, en un estudio llevado a cabo en líneas celulares de cáncer de mama (102) donde se incluyó la línea celular MCF-7 (considerada representativa de estadios III pre-metastásicos) y la línea celular MDA-MB-231 (representativa de estadio IV metastásico), se observó que la localización de BIK en esta última línea celular en vez de estar localizada en el citosol (donde se esperaría por su localización a nivel de retículo endoplásmico), se observó inicialmente en núcleo y al recibir Cisplatino, se produjo un cambio de localización hacia el citosol.

De esta manera, nuestros hallazgos sugieren un potencial valor pronóstico de BIK a nivel de proteína que amerita mayor estudio abordando no sólo su nivel de expresión en células

tumorales de cáncer de mama, sino también su interacción con otras proteínas de la vía de apoptosis y de autofagia en las cuales participa, su localización celular en relación a los estadios clínicos del cáncer de mama y también su co-localización con proteínas ya descritas como GRP78 y BCL-2 que se sabe intervienen en la regulación de BIK (96). Por otro lado, también resulta interesante considerar a BIK en la propuesta de estrategias terapéuticas que al lograr incremento en su expresión, pudieran mejorar la respuesta a tratamiento e incluso la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. En este sentido, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación encontramos correlación estadísticamente significativa entre la expresión de *BIK/NBK* a nivel mRNA con la expresión de ER $\alpha$  a nivel proteico en muestras de tejido canceroso mamario, por lo que propusimos la posibilidad de una mejor respuesta a tratamiento hormonal en pacientes con sobre-expresión de *BIK/NBK*. Además, el observar una expresión reducida de *BIK/NBK* en pacientes con ER $\alpha$  negativos pudiera indicar la participación de BIK/NBK en la regulación de la resistencia a terapia antiestrogénica (67).

Fu y colaboradores reportaron que adicionalmente GRP78 confería resistencia a la apoptosis inducida por la deprivación de estrógenos en células de cáncer de mama a través de un mecanismo mediado por BIK (77). Así BIK, también pudiera ser considerado como blanco terapéutico, dado que sus niveles de expresión pueden incrementarse por la inhibición de GRP78, inhibidores de proteasoma y doxorubicina, con lo cual también pudiera esperarse un incremento en la eficiencia del tratamiento hormonal antiestrogénico.

En cuanto a la expresión de BECN1 en tejido mamario de cáncer de mama, encontramos asociación estadísticamente significativa con menor supervivencia global y con recidiva tanto local como sistémica. Dado que la mayor función de BECN1 es inducir muerte celular, se esperaría una disminución en la expresión proteica de BECN1 en tejido canceroso, sin embargo, un estudio realizado por Ahn y colaboradores (88), reportaron un incremento en la

expresión proteica de BECN1 en células de cáncer colorectal, lo cual al igual que en nuestro estudio, podría ser interpretado de diversas formas. Primero, la expresión de BECN1 puede contribuir a la inducción de la muerte celular autofágica y producir presión selectiva para anular la muerte celular durante el desarrollo y progresión del cáncer; de esta forma es posible que las células de cáncer seleccionadas puedan tener mecanismos de resistencia contra la muerte celular autofágica dependiente de BECN1. En segundo lugar, la expresión elevada de BECN1 puede ser un mecanismo intacto que trata de contrarrestar a los factores promotores de crecimiento celular; desde esa perspectiva, la sobreexpresión de BECN1 en cáncer puede no necesariamente contribuir a la carcinogénesis por sí misma.

Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio parecen sugerir que la inhibición de la autofagia y no la estimulación de la autofagia en pacientes con sobreexpresión de BECN1, pudiera conducir a la muerte de células en cáncer de mama localmente avanzado, por lo que es necesario extender el estudio a otros estadios clínicos de la enfermedad y diversos inmunofenotipos de cáncer de mama.

Por último, en relación a la expresión de ER $\beta$  citoplásmico, a diferencia de lo reportado por Shaaban y colaboradores(58), encontramos asociación de la expresión intensa de ER $\beta$  citoplásmico con mayor frecuencia de respuesta clínica completa, sin embargo es importante mencionar que los anticuerpos utilizados en el estudio de Shaaban y cols. eran específicos para la isoforma ER $\beta$ 2, cuya sobre-expresión se asoció con peor supervivencia global, mientras que en nuestro estudio el anticuerpo utilizado para identificar ER $\beta$  no permitía identificar cada una de las isoformas de este receptor. Por lo que es pertinente realizar la evaluación de la expresión de las diversas isoformas de este receptor, ya que incluso Shaaban y colaboradores señalaron que las otras isoformas que estudiaron (ER $\beta$ 3 y ER $\beta$ 5) no se asociaron con la supervivencia global (58).

## **VI. CONCLUSIONES**

En conclusión, en nuestro estudio observamos que en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado, la expresión de GRP78 se asocia con mayor frecuencia de recidiva local y probablemente con resistencia a tratamiento. Tanto la expresión de BIK como la de ER $\beta$  citoplásmico se asocian con mayor frecuencia de respuesta clínica completa; mientras que sólo la expresión de BIK se asocia con mayor respuesta patológica. La expresión de BECN1 se asocia con una peor supervivencia global, y recidiva tanto local como sistémica.

Es necesario continuar el estudio de éstas y otras proteínas que participan en la activación de respuesta a proteínas mal plegadas y regulación de la autofagia y apoptosis, con la finalidad de identificar patrones de expresión en el grupo de proteínas que conforman estas vías, que permitan predecir respuesta a terapia hormonal y quimioterapéutica, así como recurrencia y supervivencia en mujeres no sólo con cáncer de mama localmente avanzado, sino también en otros estadios clínicos.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. 2016;66(1):7–30.
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadística a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. *Inst Nac Estadística y Geogr*. 2015;1–15.
5. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2009;151(4):716–26.
6. Hendrick RE, Helvie MA. United States preventive services task force screening mammography recommendations: Science ignored. *Am J Roentgenol*. 2011;196(2):112–6.
7. Cárdenas Sánchez J, Sandoval Guerrero F, Alatríste Martínez S, Alvarado Cabrero I, Barroso Bravo S, Bargallo Rocha JE, et al. Tercera revisión del Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario (Primera de tres partes). *Ginecol Obstet Mex*. 2010;78(1):72–82.
8. Yuan Z, Qu X, Zhang Z-T, Wang Y. Neoadjuvant chemotherapy in patients with stages II and III breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. China; 2009 Dec;122(24):2993–7.
9. Van Dalen A, Heering KJ, Barak V, Peretz T, Cremaschi A, Geroni P, et al. Treatment response in metastatic breast cancer. A multicentre study comparing UICC criteria and tumour marker changes. *The Breast*, 2016;15(2):82–8.
10. Cárdenas Sánchez J, Sandoval Guerrero F, Alatríste Martínez S, Alvarado Cabrero I, Barroso Bravo S, Bargallo Rocha JE, et al. Tercera revisión del Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario (Segunda de tres partes). *Ginecol Obstet Mex*. 2010;78(2):138–50.
11. [Guideline] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. V 1.2016. National Comprehensive Cancer Network. [Internet]. [cited 2016 May 15]. Available from: Available at [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).
12. Yalcin B. Overview on locally advanced breast cancer: Defining, epidemiology, and overview on neoadjuvant therapy. *Exp Oncol*. 2013;35(4):250–2.
13. Simos D, Clemons M, Ginsburg OM, Jacobs C. Definition and consequences of locally advanced breast cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*. United States; 2014 Mar;8(1):33–8.
14. Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso MJ, Cardoso F. Management of locally advanced breast cancer—perspectives and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;12(3):147–62. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2015.13>
15. Schootman M, Lian M, Deshpande AD, Baker EA, Pruitt SL, Aft R, et al. Temporal trends in area socioeconomic disparities in breast-cancer incidence and mortality, 1988-2005. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(2):533–43.
16. Cortés-flores AO, Morgan-villela G, Castro-cervantes JM, Vázquez-camacho G, Fuentes-orozco C, González-ojeda A. Tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado. Comparación de dos esquemas a base de docetaxel-epirrubicina versus 5-fluoraciloepirrubicina- ciclofosfamida. 2008;(1):23–8.
17. Newman LA. Epidemiology of Locally Advanced Breast Cancer. *Semin Radiat Oncol* 2009;19(4):195–203.

18. Nice. Early and locally advanced breast cancer : Diagnosis and Treatment [Internet]. 2009. 193 p. Available from: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12132/43413/43413.pdf>
19. Perez Sanchez V, Vela Chavez T, Mora Tiscareño a. Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Rev Inst Nac Cancerol (Mex)*. 2008;3(1):7–17.
20. Clark GM. Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;77030:17–21.
21. González-Angulo A, Hortobagyi G. Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *Management of Breast Diseases [Internet]*. 2010. p. 425–49. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84887914489&partnerID=tZOtx3y1>
22. Valagussa P, Zambetti M, Bignami P, de Lena M, Varini M, Zucali R, et al. T3b-T4 breast cancer: factors affecting results in combined modality treatments. *Clin Exp Metastasis*. ENGLAND; 1983;1(2):191–202.
23. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014;465(1):1–14.
24. Takagi M, Miki Y, Miyashita M, Hata S, Yoda T, Hirakawa H, et al. Intratumoral estrogen production and actions in luminal A type invasive lobular and ductal carcinomas. *Breast Cancer Res Treat [Internet]*. 2016;156(1):45–55. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-016-3739-6>
25. Tichy JR, Lim E, Anders CK. Breast Cancer in Adolescents and Young Adults: A Review With a Focus on Biology. *J Natl Compr Cancer Netw [Internet]*. 2013 Sep 1;11 (9 ):1060–9. Available from: <http://www.jnccn.org/content/11/9/1060.abstract>
26. Daryani, Ali Pourzand, M. Bassir A. Fakhree, Shahryar Hashemzadeh, Monireh Halimi. Hormone Receptor Status in Breast Cancer and its Relation to Age and Other Prognostic Factors. *Breast Cancer Basic Clin Res [Internet]*. 2011;87. Available from: <http://www.la-press.com/hormone-receptor-status-in-breast-cancer-and-its-relation-to-age-and-o-article-a2658>
27. Ballesteros G, Campos M, Müller B. Tratamiento del Cáncer de Mama Localmente Avanzado [Internet]. *Medwave*. 2010. Available from: <http://www.mednet.cl/link.cgi/>
28. Giordano SH. Update on Locally Advanced Breast Cancer. *Oncologist [Internet]*. 2003;8(6):521–30. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/8/6/521.full>
29. Pawlicki M, Skolyszewski J, Brandys A. Results of combined treatment of patients with locally advanced breast cancer. *Tumori*. ITALY; 1983 Jun;69(3):249–53.
30. Swain SM, Sorace RA, Bagley CS, Danforth DN, Bader J, Wesley MN, et al. Neoadjuvant chemotherapy in the combined modality approach of locally advanced nonmetastatic breast cancer. *Cancer Res*. 1987;47(14):3889–94.
31. Cocconi G, di Blasio B, Bisagni G, Alberti G, Botti E, Anghinoni E. Neoadjuvant chemotherapy or chemotherapy and endocrine therapy in locally advanced breast carcinoma. A prospective, randomized study. *Am J Clin Oncol*. UNITED STATES; 1990 Jun;13(3):226–32.
32. Morris PG, Hudis CA, Dang CT. Anthracyclines are a critical component of adjuvant chemotherapy regimens for high-risk early breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. United States; 2011 Feb;25(2):134–5,138,140.
33. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. United States; 2007;608:1–22.
34. Untch M, Konecny GE, Paepke S, von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *The Breast [Internet]*. Elsevier Ltd;

- 2014;23(5):526–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977614001143>
35. Trudeau M, Sinclair SE, Clemons M. Neoadjuvant taxanes in the treatment of non-metastatic breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(4):283–302.
  36. Vici P, Viola G, Rossi S, Botti C, Vitucci C, Sergi D, et al. Optimal sequence of anthracyclines and taxanes as adjuvant breast cancer treatment. *Clin Ter. Italy;* 2008;159(6):453–6.
  37. Ferguson T, Wilcken N, Vagg R, Ghersi D, Nowak AK. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane database Syst Rev. England;* 2007;(4):CD004421.
  38. Gajria D, Seidman A, Dang C. Adjuvant taxanes: more to the story. *Clin Breast Cancer. United States;* 2010 Sep;10 Suppl 2:S41–9.
  39. Herrada J, Iyer RB, Atkinson EN, Sneige N, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Relative value of physical examination, mammography, and breast sonography in evaluating the size of the primary tumor and regional lymph node metastases in women receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(9):1565–9.
  40. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurlteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol. UNITED STATES;* 1993 Jun;16(3):223–8.
  41. Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Ames FC, Blumenschein GR. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 1986;46(5):2578–81.
  42. Untch M, von Minckwitz G. Recent advances in systemic therapy: advances in neoadjuvant (primary) systemic therapy with cytotoxic agents. *Breast Cancer Res [Internet].* 2009;11(2):203. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688938&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
  43. Gajdos C, Tartter PI, Estabrook A, Gistrak MA, Jaffer S, Bleiweiss IJ. Relationship of clinical and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy and outcome of locally advanced breast cancer. *J Surg Oncol. United States;* 2002 May;80(1):4–11.
  44. Machiavelli MR, Romero AO, Perez JE, Lacava JA, Dominguez ME, Rodriguez R, et al. Prognostic significance of pathological response of primary tumor and metastatic axillary lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Cancer J Sci Am. UNITED STATES;* 1998;4(2):125–31.
  45. Kuerer HM, Newman LA, Buzdar AU, Hunt KK, Dhingra K, Buchholz TA, et al. Residual metastatic axillary lymph nodes following neoadjuvant chemotherapy predict disease-free survival in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg. UNITED STATES;* 1998 Dec;176(6):502–9.
  46. Chávez-MacGregor M, González-Angulo AM. Breast cancer, neoadjuvant chemotherapy and residual disease. *Clin Transl Oncol [Internet].* 2010;12(7):461–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-010-0538-0>
  47. No H, Castelazo L, Jj BV, F MR, Jm VS, I BP, et al. Respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama etapa clínica III en el Hospital de Gineco-obstetricia No . 4 “ Luis Castelazo Ayala .” 2008;7(4):52–5.
  48. Bergh J. Adjuvant chemotherapy for breast cancer--“one fits all”? *Breast. Scotland;* 2005 Dec;14(6):564–9.
  49. Baehner FL, Lee M, Demeure MJ, Bussey KJ, Kiefer JA, Barrett MT. Genomic signatures of cancer: Basis for individualized risk assessment, selective staging and therapy. *J Surg Oncol.* 2011;103(6):563–73.
  50. Eroles P, Bosch A, Alejandro P??rez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast



- cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;38(6):698–707. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
51. McCafferty MPJ, Healy NA, Kerin MJ. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathol* [Internet]. Elsevier; 2016 May 15;15(10):485–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpdhp.2009.07.002>
  52. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* [Internet]. 2006;95(5):616–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603295>
  53. Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;56(SUPPL. 7):21–6.
  54. Baek J-M, Chae B-J, Song B-J, Jung S-S. The potential role of estrogen receptor  $\beta$ 2 in breast cancer. *Int J Surg* [Internet]. Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 137-701, Republic of Korea.; 2015;14:17–22. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/25450264>
  55. Fuqua SAW, Schiff R, Parra I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK, et al. Estrogen Receptor {beta} Protein in Human Breast Cancer: Correlation with Clinical Tumor Parameters. *Cancer Res* [Internet]. 2003;63(10):2434–9. Available from: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/10/2434.abstract?ijkey=513546e20902478e03bde83aeb33d582a36bef4a&keytype=tf\\_ipsecsha](http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/10/2434.abstract?ijkey=513546e20902478e03bde83aeb33d582a36bef4a&keytype=tf_ipsecsha)
  56. Mann S, Laucirica R, Carlson N, Younes PS, Ali N, Younes a, et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001;32:113–8.
  57. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, et al. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008;26(22):3727–34. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18669459](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18669459)
  58. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, et al. Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER 1, ER 2, and ER 5 Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008;14(16):5228–35. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-4528>
  59. Jensen E V, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Mäkelä S, Van Noorden S, et al. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(26):15197–202. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=65006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  60. Skliris GP, Parkes AT, Limer JL, Burdall SE, Carder PJ, Speirs V. Evaluation of seven oestrogen receptor ?? antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue. *J Pathol*. 2002;197(2):155–62.
  61. Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MPA, Sibson R, West CR, Smith PH, et al. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol*. United States; 2003 Dec;27(12):1502–12.
  62. Elebro K, Borgquist S, Rosendahl A, Markkula A, Simonsson M, Jirström K, et al. Estrogen receptor beta expression is prognostic among chemotherapy-treated patients – Results from a population-based breast cancer cohort. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Feb 18;76(4 Supplement):P5–08 – 27–P5 – 08–27. Available from: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/4\\_Supplement/P5-08-27.abstract](http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/4_Supplement/P5-08-27.abstract)
  63. Pultz B dos A, da Luz FAC, de Faria PR, Oliveira APL, de Ara??jo RA, Silva MJB. Far

- beyond the usual biomarkers in breast cancer: A review. *J Cancer*. 2014;5(7):559–71.
64. Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: Clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;17(6):313–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.006>
  65. García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R, et al. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* [Internet]. 2005;5:93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1198222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  66. Hur J, Chesnes J, Coser KR, Lee RS, Geck P, Isselbacher KJ, et al. The Bik BH3-only protein is induced in estrogen-starved and antiestrogen-exposed breast cancer cells and provokes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(8):2351–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  67. López-Muñoz E, Hernández-Zarco A, García-Hernández N, Alvarado-Cabrero I, Zarco-Espinosa G, Salamanca-Gómez F, et al. BIK/NBK gene as potential marker of prognostic and therapeutic target in breast cancer patients. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2012;14(8):586–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855140>
  68. Pandya V, Glubrecht D, Vos L, Hanson J, Mackey J, Hugh J, et al. The pro-apoptotic paradox: the BH3-only protein Bcl-2 interacting killer (Bik) is prognostic for unfavorable outcomes in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27120789>
  69. Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat. NETHERLANDS*; 2000 Jan;59(1):15–26.
  70. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*. 2006;6(1):45–54.
  71. Dong D, Ko B, Baumeister P, Swenson S, Costa F, Markland F, et al. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2005;65(13):5785–91.
  72. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. Role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*. 2003;278(23):20915–24.
  73. Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA. Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006;66(3):1702–11.
  74. Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(16):7849–53.
  75. Lee E, Nichols P, Groshen S, Spicer D, Lee AS. GRP78 as potential predictor for breast cancer response to adjuvant taxane therapy. *Int J Cancer* [Internet]. 2011;128(3):726–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25370>
  76. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2001 Aug;26(8):504–10. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000401019089>
77. Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* United States; 2006 Jul;5(7):741–4.
  78. Koumenis C. ER Stress , Hypoxia Tolerance and Tumor Progression in tumor progression and response. *Current.* 2006;2:55–69.
  79. Pendharkar N, Gajbhiye A, Taunk K, RoyChoudhury S, Dhali S, Seal S, et al. Quantitative tissue proteomic investigation of invasive ductal carcinoma of breast with luminal B HER2 positive and HER2 enriched subtypes towards potential diagnostic and therapeutic biomarkers. *J Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.;* 2016;132:112–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.024>
  80. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene [Internet]. Nature Publishing Group;* 2008;27 Suppl 1(S1):S137–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  81. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1809–20.
  82. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, et al. Autophagy Gene-Dependent Clearance of Apoptotic Cells during Embryonic Development. *Cell.* 2007;128(5):931–46.
  83. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2003;100(25):15077–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657337>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC299911>
  84. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature [Internet].* 1999;402(6762):672–6. Available from: <Go to ISI>://WOS:000084189800068
  85. Won KY, Kim GY, Kim YW, Song JY, Lim SJ. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. *Hum Pathol [Internet]. Elsevier Inc.;* 2010;41(1):107–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.006>
  86. John S, Nayvelt I, Hsu HC, Yang P, Liu W, Das GM, et al. Regulation of estrogenic effects by beclin 1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(19):7855–63.
  87. Clarke R, Shajahan AN, Riggins RB, Cho Y, Crawford A, Xuan J, et al. Gene network signaling in hormone responsiveness modifies apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(1-2):8–20.
  88. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, Kim MS, Kim SH, Kim SS, et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS. Denmark;* 2007 Dec;115(12):1344–9.
  89. Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1772–86.
  90. Graves PR, Haystead T a J. *Molecular Biologist ' s Guide to Proteomics.* *Microbiol Mol Biol Rev Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(1):39–63.
  91. Kellner R. *Proteomics. Concepts and perspectives.* *Fresenius J Anal Chem. Germany;* 2000;366(6-7):517–24.
  92. Taylor CR. *Histopathology.* 2014;1180:81–109. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1050-2>
  93. Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry--The Red, Brown, and Blue

- Technique. *Vet Pathol* [Internet]. 2014;51(1):42–87. Available from: <http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985813505879>
94. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784–95.
  95. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, Mcshane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997–4014.
  96. Zhou H, Zhang Y, Fu Y, Chan L, Lee AS. Novel mechanism of anti-apoptotic function of 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78). *J Biol Chem*. 2011;286(29):25687–96.
  97. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008;27 Suppl 1(S1):S20–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.40>
  98. Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grandér D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44317–26.
  99. Paquet C, Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R. Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells. *Apoptosis*. United States; 2004 Nov;9(6):815–31.
  100. Li C, Li R, Grandis JR, Johnson DE. Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008;7(6):1647–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2534142&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
  101. Pandya V, Glubrecht D, Vos L, Hanson J, Mackey J, Hugh J, et al. The pro-apoptotic paradox: the BH3-only protein Bcl-2 interacting killer (Bik) is prognostic for unfavorable outcomes in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(22). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27120789>
  102. Trejo-Vargas A, Hernández-Mercado E, Ordóñez-Razo RM, Lazzarini R, Arenas-Aranda DJ, Gutiérrez-Ruiz MC, et al. Bik subcellular localization in response to oxidative stress induced by chemotherapy, in Two different breast cancer cell lines and a Non-tumorigenic epithelial cell line. *J Appl Toxicol* [Internet]. 2015;(August 2014):n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.3173>
  103. Roller C, Maddalo D. The molecular chaperone GRP78/BiP in the development of chemoresistance: Mechanism and possible treatment. *Front Pharmacol*. 2013;4 FEB(February):1–5.
  104. Luo B, Lee a S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;32(February):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.130>
  105. Li B, Cheng XL, Yang YP, Li ZQ. GRP78 mediates radiation resistance of a stem cell-like subpopulation within the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncol Rep*. 2013;30(5):2119–26.
  106. Daneshmand S, Quek ML, Lin E, Lee C, Cote RJ, Hawes D, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol*. 2007;38(10):1547–52.
  107. Xie J, Tao Z-H, Zhao J, Li T, Wu Z-H, Zhang J-F, et al. Glucose regulated protein 78 (GRP78) inhibits apoptosis and attentinutes chemosensitivity of gemcitabine in breast

cancer cell via AKT/mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*  
[Internet]. Elsevier Ltd; 2016;78. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16303151>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1. ESTADIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA

#### Tumor primario

Las definiciones para clasificar el tumor primario (T) son las mismas para la clasificación clínica y patológica. Si las mediciones son hechas por exploración física, el médico debe usar los estadios mayores (T1, T2 o T3). Si se realizan otras mediciones tales como la mamografía o estudio histopatológico puede usarse los subgrupos de los estadios mayores (11).

Tx	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma Ductal in situ
Tis (LCIS)	Carcinoma lobular in situ
Tis (Paget)	Enfermedad de Pager del pezón sin tumor
T1	Tumor de 2 cm o menor
T1mic	Microinvasión de 0.1 cm o menos
T1a	Tumor mayor de 0.1 cm y menor de 0.5 cm
T1b	Tumor mayor de 0.5 cm y menor de 1 cm
T1c	Tumor mayor de 1 cm y menor de 2 cm
T2	Tumor mayor de 2 cm y menor de 5 cm
T3	Tumor mayor de 5 cm
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica o piel
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir músculo pectoral
T4b	Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

## Ganglios linfáticos regionales

### Clínico

NX	Ganglios linfáticos no pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos
N1	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, móviles ipsilaterales
N2	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, fijos o ganglios linfáticos mamarios internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares.
N2a	Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos
N2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos
N3	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares con o sin afección de ganglios linfáticos axilares
N3a	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales
N3b	Metástasis en ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos ipsilaterales
N3c	Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales

### Patológico (pN)

pNX	No pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
pN0	No hay metástasis a ganglios linfáticos histológicamente. Pruebas adicionales (moleculares o inmunohistoquímicas negativas).
pN0(i-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica negativa.
pN0 (i+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica positiva.
pN0 (mol-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. RT-PCR negativa.
pN0 (mol+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. RT-PCR positiva.
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y/o ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela pero no identificable clínicamente.
pN1mic	Micrometástasis (mayor de 0.2 mm y menor de 2.0 mm)
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o clínicamente con ganglios mamarios internos
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares
pN2b	Metástasis en apariencia clínica en ganglios mamarios internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares o metástasis a ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis clínicamente aparentes en ganglios mamarios internos ipsilaterales en presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por un ganglio centinela sin afección clínica aparente.
pN3c	Metástasis en ganglios superclaviculares ipsilaterales

Metástasis a distancia

MX	No puede evaluarse metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Clasificación por estadios

ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ESTADIO IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ESTADIO IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
ESTADIO IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
ESTADIO IIIC	CUALQUIER T	N3	M0
ESTADIO IV	CUALQUIER T	CUALQUIER N	M1



## **ANEXO 2. SISTEMA SCARF-BLOOM-RICHARDSON MODIFICADO PARA DETERMINAR GRADO HISTOLÓGICO.**

En este sistema, el puntaje se asigna de acuerdo a la proporción de formación de túbulos correspondiendo un punto si el 75% o más del tumor presenta túbulos, dos puntos si el 10-75% del tumor tiene formación de túbulos y 3 puntos si la formación de túbulos es menor a 10%.

El grado nuclear, otorgándose un punto si el núcleo es pequeño pero muy similar a un núcleo normal, dos puntos si el núcleo es mayor que uno normal y presenta cromatina en grumos y 3 puntos cuando el núcleo tiene una variación marcada en forma, tamaño y patrón de la cromatina con dos o más nucléolos.

El número de mitosis, asignándose un punto para 0-9 mitosis por 10 campos de gran aumento, dos puntos para 10 a 19 mitosis y tres puntos para 20 o más mitosis.

El puntaje total permite conocer el grado histológico; para un puntaje de 3 a 5 corresponde el grado 1 (tumor más diferenciado), para un puntaje de 6-7 corresponde el grado 2 y para un puntaje de 8-9, el grado 3 (menos diferenciado) (19,23).

### ANEXO 3. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**FOLIO:** \_\_\_\_\_

#### ***Sociodemográficos***

Nombre: \_\_\_\_\_ Afiliación: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

#### ***Características del diagnóstico***

Fecha del diagnóstico: \_\_\_\_\_

Estadio clínico según clasificación TNM: \_\_\_\_\_

#### ***Características patológicas***

Tipo histológico: \_\_\_\_\_

Grado histológico: \_\_\_\_\_

Número de ganglios por región con metástasis: \_\_\_\_\_

Tamaño tumoral: \_\_\_\_\_

Límite del tumor: \_\_\_\_\_

#### ***Características de los receptores (Inmunohistoquímica)***

Estrógenos  $\alpha$  Intensidad: \_\_\_\_\_ Estrógenos  $\alpha$  Porcentaje: \_\_\_\_\_

Estrógenos  $\beta$  Intensidad: \_\_\_\_\_ Estrógenos  $\beta$  Porcentaje: \_\_\_\_\_

#### ***Expresión de BIK y GRP78 (Inmunohistoquímica)***

BIK Intensidad: \_\_\_\_\_ BIK Porcentaje: \_\_\_\_\_

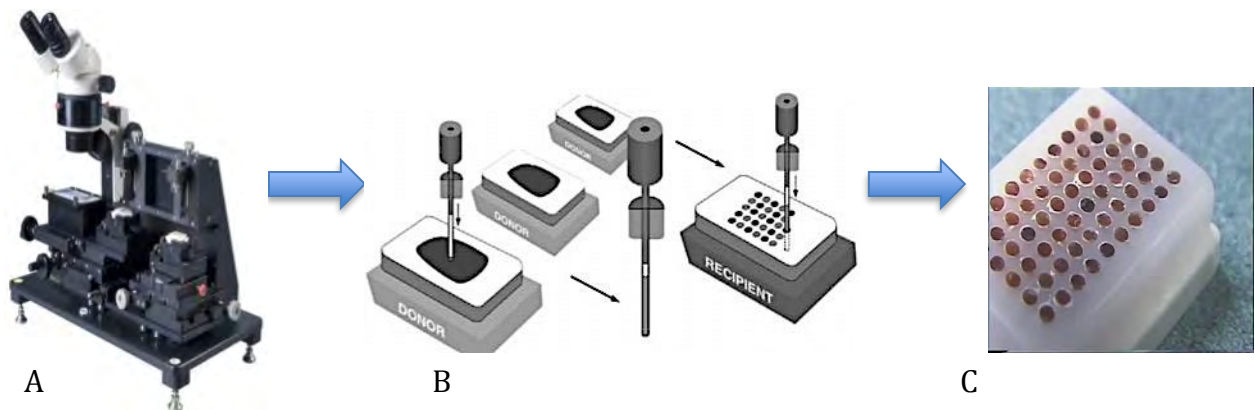
GRP78 Intensidad: \_\_\_\_\_ GRP78 Porcentaje: \_\_\_\_\_

BECN1 Intensidad: \_\_\_\_\_ BECN1 Porcentaje: \_\_\_\_\_

#### ANEXO 4. CONSTRUCCIÓN DE MICROARREGLOS DE TEJIDO Y PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Previo a la realización del protocolo de inmunohistoquímica, es necesario realizar la construcción de los microarreglos de tejido.

Primero se tienen que seleccionar áreas representativas del tumor en la laminilla teñida con hematoxilina y eosina, y después marcar esas mismas áreas en el bloque de tejido embebido en parafina. Una vez hecho esto, se procede a realizar perforaciones en los bloques de parafina (bloque donador) de 1mm de diámetro que fueron colocadas en un bloque aceptor, mediante el microarreglador de tejidos ATA 100 de CHEMICON. Por cada bloque se colocan muestras por triplicado o duplicado, dependiendo de la cantidad de tejido disponible; adicionalmente se colocan tejidos control. (Figura 13)



**Figura 12. Construcción de un microarreglo de tejido.** En la imagen A, observamos el microarreglador de tejidos ATA 100 de CHEMICON; en la imagen B, observamos cómo la aguja perfora el bloque donador tomando un cilindro de tejido de 1 mm de diámetro, el cual es posteriormente introducido mediante la misma aguja en el bloque aceptor, quedando conformado el microarreglo como lo vemos en la imagen C.

Una vez construido el microarreglo, se cubre con paraplast a 60°C y se incuba en horno a 60°C por 10 minutos. Posteriormente se realizan cortes de 4µm en el microarreglo y se colocan en laminillas electrocargadas. Ya secas las laminillas, se puede proceder a la realización de inmunohistoquímica.

Antes de iniciar es necesario revisar que los reactivos del equipo Ventana Benchmark se encuentren en la cantidad suficiente de acuerdo al número de laminillas a procesar; de igual manera, es necesario corroborar que el contenedor de desechos no esté lleno.

Se localiza el protocolo a utilizar, dependiendo del anticuerpo que se vaya a emplear para la detección específica de determinada proteína, y se imprimen las etiquetas para cada laminilla, las cuales deben estar rotuladas con identificador del microarreglo al que correspondan, nombre de quien procesa la muestra, y condiciones básicas del protocolo como el pretratamiento (CC1 o CC2) y el tiempo de duración, y anticuerpo con la dilución.

Las etiquetas se colocan en cada laminilla y una vez hecho esto, las laminillas se colocan en los termopads del equipo ventana, teniendo cuidado de que estén bien colocadas.

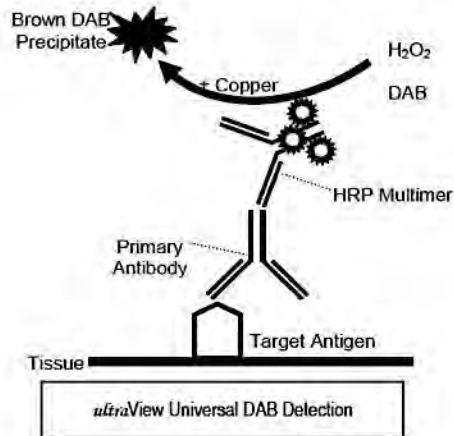
Se procede a montar los reactivos del kit UltraView Dab Universal en el carrusel del equipo Ventana Benchmark, en el siguiente orden:

1. UV inhibitor (solución de peróxido de hidrógeno al 3%)
2. UV HRP (cocktail de anticuerpos marcados HRP)
3. UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.04% de peróxido de hidrógeno en solución buffer de fosfato)
4. UV DAB (0.2% 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocluro en solución estabilizadora)
5. UV COPPER (sulfato de cobre 5g/ml en buffer de acetato con un preservativo)
6. Hematoxilina
7. UV Bluing

Una vez colocado el carrusel en el equipo, se inicia el protocolo en el software del equipo y se espera a que el equipo lea cada una de las etiquetas de las laminillas y de los reactivos

para corroborar que correspondan al protocolo que se llevará a cabo; una vez concluido este paso, da inicio la reacción automatizada de inmunohistoquímica.

El sistema UltraView Dab Universal detecta anticuerpos primarios específicos de ratón y conejo unidos a un antígeno en secciones de tejido embebidas en parafina. El anticuerpo específico es localizado por un cocktail de anticuepos secundarios marcados con enzimas (método indirecto de inmunohistoquímica). Este complejo es visualizado con el sustrato de peróxido de hidrógeno y el cromógeno DAB, el cual produce un precipitado color café, el cual es posible visualizar bajo el microscopio. (Figura 14).



**Figura 14. Sistema de detección UltraView Dab Universal.** En la imagen podemos observar como el anticuerpo primario se une al antígeno blanco (proteína) y después un anticuerpo secundario que detecta anticuerpos primarios tanto de ratón como de conejo, en forma general, se une al anticuerpo primario. El anticuerpo se encuentra marcado con peroxidasa de rábano (HRP), cuyo sustrato es la 3, 3' diaminobenzidina; la catalización de este último por la enzima HRP produce un precipitado en el sitio, que puede ser visualizado por microscopía.

El protocolo de tinción consiste en múltiples pasos en los cuales los reactivos son incubados por un periodo de tiempo determinado a temperaturas específicas:

	Dilución al inicio de estandarización	Dilución final	Pretratamiento	Tiempo
<b>BECN1</b>	1:100	1:100	CC1	30 minutos
<b>GRP78</b>	1:500	1:500	CC1	30 minutos
<b>ER<math>\beta</math></b>	1:100	1:250	CC1	30 minutos
<b>BIK</b>	1:400	1:250	CC1	30 minutos
<b>HER2</b>	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos
<b>PR</b>	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Prediluido	Prediluido	CC1	30 minutos

Se utilizó CC1, la cual es una solución de acondicionamiento celular (buffer a base de Tris), como paso de pretratamiento en el procesamiento de las muestras de tejido para inmunohistoquímica. Esta fase de pretratamiento se utiliza para eliminar los entrecruzamientos mediante puentes de metileno en las proteínas y las uniones covalentes entre grupos aldehído y amino, que se pudieron haber formado durante la fijación del tejido con formalina, y que impiden la penetración de los anticuerpos en el tejido y llevan a la pérdida de antigenicidad por desnaturalización proteica, respectivamente.

Al final de cada paso de incubación, el equipo Ventana lava las secciones para remover el material no ligado y aplica una cubierta líquida que minimiza la evaporación de los reactivos líquidos de la laminilla.

Al finalizar el protocolo de inmunohistoquímica, es necesario retirar las laminillas del equipo Ventana y enjuagarlas con agua y jabón, dejando secar a temperatura ambiente.

Se deben limpiar los termopads con un cepillo y agua destilada.

Una vez secas las laminillas, es necesario cubrirlas con un cubreobjetos, el cual se fija mediante una resina. Una vez seca la resina, entonces se puede proceder a visualizar la laminilla al microscopio, para su interpretación y análisis.