



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

**EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR
DE ESTRÓGENO TIPO BETA EN PACIENTES CON CÁNCER
DE MAMA TRATADAS INICIALMENTE DE FORMA
QUIRÚRGICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

PRESENTA:

DRA. JESSICA ELIZABETH SALAZAR CAMPOS

DR. DAVID FRANCISCO CANTU DE LEÓN

DIRECTOR DE TESIS



CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE
ESTRÓGENO TIPO BETA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
TRATADAS INICIALMENTE DE FORMA QUIRÚRGICA**

Dr. David Francisco Cantú de León

Presidente de Tesis

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia

Subdirectora de Educación Médica

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Jessica Elizabeth Salazar Campos

Médico Residente de Tercer Grado Ginecología Oncológica

Autor

Instituto Nacional de Cancerología

TITULO:

**EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE
ESTRÓGENO TIPO BETA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
TRATADAS INICIALMENTE DE FORMA QUIRÚRGICA**

COLABORADORES

Dr. David Francisco Cantú de León

Presidente de Tesis, Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Raul Díaz Molina

Asesor Metodológico, Universidad Autónoma de Baja California

Dr. Horacio Zamudio Meza

Asesor Metodológico, Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Pérez Sánchez

Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Alejandro Javier España Ferrufino

Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Carlos Pérez Plascencia

Instituto Nacional de Cancerología

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La evaluación de los receptores estrogénicos beta ($ER\beta$) no se realiza en el abordaje convencional de las pacientes con cáncer de mama. Durante más de 30 años se ha determinado únicamente la presencia de los receptores estrogénicos alfa ($ER\alpha$) y de progesterona como factores pronóstico y predictivo. En la actualidad sabemos que hasta un 30 a 40% de los tumores que de acuerdo con su estatus hormonal expresan receptores hormonales positivos, no responden a la terapia endocrina, sin poder explicar de forma clara este suceso, incluso, hasta un 10% presentan recaída durante el tratamiento. Por otro lado, se ha observado que pacientes que muestran un estatus hormonal negativo se benefician del tratamiento hormonal, lo que ha servido como base para el desarrollo de múltiples estudios tanto en líneas celulares, tejido fresco congelado, como en tejidos conservados en bloques de parafina, en los que se ha tratado de identificar la presencia de $ER\beta$ y correlacionarlos con las características clínico-patológicas. Sin embargo, el receptor de estrógenos beta presenta 6 isoformas, cuya ausencia o presencia en el tejido tumoral pudieran explicar la falta de correlación entre el estatus hormonal y la respuesta al tratamiento que se ha reportado en muchos casos. En este contexto, en la mayoría de las investigaciones enfocadas en la identificación de isoformas del $ER\beta$, se ha buscado principalmente las isoformas 1 y 2, y los estudios se han realizado mayormente en líneas celulares. **OBJETIVO:** Identificar el perfil de expresión génica de las 6 isoformas del receptor estrogénico tipo β en pacientes con cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas con cirugía de forma inicial en el Instituto Nacional de Cancerología. **METODOLOGÍA:** Estudio descriptivo, retrospectivo, pacientes diagnosticadas con cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas de forma inicial con cirugía, del 01 de enero al 31 de diciembre de 2012, en el Instituto Nacional de Cancerología; y cuyas muestras de tejido tumoral conservadas en bloques de parafina y en cantidad suficiente para el estudio. La expresión génica de las seis isoformas del $ER\beta$ se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, a partir de las muestras de tejido. **RESULTADOS.** Se incluyeron un total de 40 tejidos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que cumplieron los criterios de inclusión. La edad

promedio de las pacientes fue de 54 años con un rango de 29 a 73 años, IMC promedio de 28.38 ± 5.45 . Con respecto a las características patológicas el tamaño del tumor tuvo un promedio de 20.85 ± 9.36 mm, con axila patológica positiva a macrometástasis en 13 pacientes (13/40); con respecto a las etapas patológicas, 16 fueron IA, 17 IIA y 5 IIB, mientras que 2 se identificaron como etapa IIIA. La estirpe más frecuente fue el Ductal (38/40), el grado histológico más frecuente fue el G2 con 17/40, presentaron permeación linfovascular 14 pacientes, receptores estrogénicos más de 20% en 36 pacientes, y receptores de progesterona más de 40% en 28 pacientes. Con base en el perfil molecular, el HER-2 se sobreexpresó en 6 pacientes, 34 fueron luminal, y ninguno resultó triple negativo. Todas las pacientes fueron seguidas durante al menos 48 meses, tiempo en el cual se presentaron 4 recurrencias: una local, dos locorregional y una a distancia, con un fallecimiento. El periodo libre de enfermedad fue de 51 ± 7 meses, con una supervivencia global de 62.54 ± 3.82 meses. Resultaron positivas de las 40 pacientes para la expresión de las diferentes isoformas: 31 pacientes para $\beta 1$ (77%), 23 para $\beta 2$ (57%), 12 para $\beta 3$ (30%), ninguna para $\beta 4$, 26 para $\beta 5$ (65%) y 2 para $\beta 6$ (5%). La expresión relativa promedio de cada una de las seis isoformas en estas pacientes fue la siguiente: 6.38 para $\beta 1$, 3.37 para $\beta 2$, 1.25 para $\beta 3$, 0.05 para $\beta 4$, 6.2 para $\beta 5$ y 6.26 para $\beta 6$. **CONCLUSIONES:** En pacientes con cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas de forma inicial con cirugía, las isoformas que mostraron mayor expresión génica en el tejido tumoral fueron $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$ del total de nuestra población. Es importante señalar que la mayor expresión génica de la isoforma $\beta 5$ correspondió al perfil molecular de HER-2 sobreexpresado. Este hallazgo permitirá realizar la búsqueda intencionada por inmunohistoquímica de estas isoformas mayormente expresadas, y sienta las bases para futuros estudios en los que se evalúe el papel pronóstico y/o predictivo de la presencia de las isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$; y la nula o muy baja expresión de las isoformas $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 6$.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
Capítulo 1	
INTRODUCCIÓN	
1.1. Antecedentes	15
1.2. Planteamiento del problema	19
1.3. Pregunta de investigación	19
1.4. Justificación	20
1.5. Objetivos	21
1.6. Hipótesis	22
Capítulo 2	
MARCO TEÓRICO	
2.1. Cáncer de mama. Generalidades.	24
2.2. Estadificación del cáncer de mama	26
2.3. Clasificación molecular del cáncer de mama	29
2.4. Factores predictivos y pronósticos	31
2.5. Receptores de estrógenos	32
2.6. Variantes del receptor estrogénico beta.	35
Capítulo 3	

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio	39
3.2. Población de estudio	39
3.3. Selección y tamaño de muestra	39
3.4. Método de muestreo	39
3.5. Instrumento para la recolección de datos	39
3.6. Criterios de selección	39
3.6.1. Criterios de inclusión	40
3.6.2. Criterios de eliminación	41
3.7. Descripción de las	
3.7.1. Variables independientes	41
3.7.2. Variables dependientes	43
3.8. Procedimientos	44
3.9. Análisis de datos	49
3.10. Aspectos éticos, normativos y de seguridad	49

Capítulo 4

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Resultados	52
4.2. Discusión	58
4.3. Conclusiones	62

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
-----------------------------------	-----------

ANEXOS	70
---------------	-----------

AGRADECIMIENTOS

A las personas que hicieron posible este trabajo.

Dr. David Francisco Cantú de León

Dr. Raul Díaz Molina

Dr. Horacio Zamudio Meza

Dr. Víctor Manuel Pérez Sánchez

Dr. Alejandro Javier España Ferrufino

Dr. Carlos Pérez Plascencia

DEDICATORIA

Dedico no sólo este trabajo sino todos mis logros, cada paso que doy, cada éxito que obtenga, a las personas más importantes en mi vida y que siempre han sido el impulso para cada una de mis metas.

Mis hijos:

Elizabeth Huante Salazar

Jorge Huante Salazar

Mi Madre:

Elizabeth Campos Sánchez

ABREVIATURAS

AJCC	The American Joint Committee on Cancer
AP1	Factor de Transcripción AP1
BAAF	Biopsia por Aspiración con Aguja Fina
ER α	Receptor Estrogénico alfa
ER β	Receptor Estrogénico beta
ERE	Elementos de Respuesta a Estrógenos
CC	Cirugía conservadora
CCNE1	Cyclin E1
dL	Decilitros
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRA	Disección Radical de Axila
HIF1A	Factor 1 Inducible por Hipoxia
GC	Ganglio Centinela
GGH	Gamma Glutamyl Hidrolase
HER2	Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
IHQ	Inmunohistoquímica
ILP	Infiltrado Linfoplasmocitario
IMC	Índice de Masa Corporal
Ki67	Marcador Celular de Proliferación
LAPTMB4	Lysosome-Associated Transmembrane Protein 4-Beta
mL	Mililitros
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
MCF-7	Línea Celular de Cáncer de Mama Humano
MRM	Mastectomía Radical Modificada
MT	Mastectomía Total

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCN	The National Comprehensive Cancer Network
nM	Nanomolar
NSEP1	Nuclease Sensitive Element Binding Protein 1
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PLE	Período Libre de Enfermedad
PLV	Permeación Linfovascular
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RE	Receptor de Estrógenos
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SG	Sobrevida Global
TNM	Tumor, Node, Metastasis
μL	Microlitros
v-MYB	Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog

LISTADO DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Niveles de expresión de las isoformas del receptor estrogénico tipo beta.	56

LISTADO DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Criterios para la estadificación del cáncer de mama según la AJCC en su 7ª edición.	26
Tabla 2	Criterios para establecer la etapa clínica del cáncer de mama según el TNM de la AJCC en su 7ª edición.	27
Tabla 3	Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA mediante la RT-PCR.	46
Tabla 4	Condiciones de reacción para la síntesis de cDNA mediante la RT-PCR.	46
Tabla 5	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada una de las isoformas de los RE β .	48
Tabla 6	Características sociodemográficas y clínicas de las pacientes.	53
Tabla 7	Características patológicas de los tumores.	54
Tabla 8	Resultado del seguimiento a 48 meses con respecto a la recurrencia, periodo libre de enfermedad (PLE) y sobrevida global (SG).	55
Tabla 9	Resultados de la expresión relativa de las isoformas del RE β en la población estudiada.	56
Tabla 10	Nivel promedio de expresión de las isoformas del ER β por perfil molecular del tejido tumoral. Los valores están expresados en Unidades Relativas de Expresión.	56
Tabla 11	Resultados por paciente de la expresión génica de las distintas isoformas del ER β . Los resultados están expresados en Unidades Relativas de Expresión.	57

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La evaluación de los ER β no se realiza en el abordaje convencional de las pacientes con cáncer de mama, durante más de 30 años se ha determinado únicamente la presencia de los ER α y de progesterona, como factores pronóstico y predictivo. En la actualidad sabemos que hasta un 30 a 40% de los tumores que de acuerdo a su estatus hormonal expresan receptores hormonales positivos no responden a la terapia endocrina, sin poder establecer de forma clara este suceso.¹ Si bien no es del todo claro el papel que juegan los ER β en el cáncer de mama, en los últimos años se han realizado avances importantes tanto a nivel de los mecanismos de acción de los estrógenos, como de su expresión en tejido tumoral, que apuntan hacia una función clave de estos receptores en el desarrollo de células tumorales y en los resultados de las terapias hormonales.

Cowley *et al.* en 1997 demostraron que la afinidad de los dímeros ER α -ER α y ER α -ER β 1 por los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA es mayor que la afinidad que muestran los dímeros ER β 1-ER β 1, requiriendo en estos casos la unión del ligando para que los complejos receptor-ligando puedan interactuar con los ERE en el DNA.² Sin embargo, ER β 2 puede formar heterodímeros con ER α o ER β 1 sin la necesidad de unirse con su ligando, pudiendo inhibir la unión de ER α y ER β 1 a los ERE. Esto plantea la posibilidad de que ER β 2 actúe como un modulador funcional de ER α y ER β 1.³

Se desconoce el grado de expresión de estos receptores en el tejido mamario normal, se sabe que la expresión génica del ER α está incrementada en el cáncer invasivo de la glándula mamaria, mientras que el ER β lo está en tejido mamario normal. Se ha sugerido que existen cambios en la expresión génica de los receptores estrogénicos ER β 1, ER β 2 y ER β 5 durante los inicios del desarrollo del cáncer, con predominio en la expresión de los ER β 2 y ER β 5. Por otro lado, se ha propuesto que la expresión del ER β 1 tiene una relación inversa con el nivel de malignidad del tumor y el grado de inflamación, mientras que el ER β 2 se eleva significativamente con el grado de infiltración de linfocitos en el tejido tumoral.⁴

Se ha investigado la posible asociación entre los niveles de mRNA del ER β con algunos parámetros clínicos del cáncer de mama. Aunque sigue siendo motivo de controversia, la mayoría de los reportes señalan que un incremento en la expresión del gen del ER β 1 se correlaciona significativamente con un buen pronóstico, y que la expresión tiende a disminuir durante la progresión de esta enfermedad,^{5,6-8,1} por ejemplo, Järvinen et al., en el 2000 publicaron un análisis de 92 especímenes de pacientes con cáncer de mama de los cuales 55 tumores presentaban positividad para el ER β , y éstos a su vez se relacionaban de forma estadísticamente significativa con ganglios negativos, grado histológico bajo y pacientes en estado premenopáusico, por lo que Järvinen et al. concluyeron que los tumores ER β positivos se asocian con características biológicas menos agresivas, que teóricamente responderían mejor a la terapia hormonal y que el ER β podría ser un factor predictivo independiente.¹

Huang *et al.*, en el 2014 mostraron que el 32% del cáncer ductal expresa receptores de estrógeno beta tipo 2, de los cuales el 83% correspondió a pacientes postmenopáusicas, también mostraron que hay una diferencia marcada entre el cáncer ductal y el lobulillar en cuanto a la expresión del receptor beta, sugiriendo que el tamoxifeno podría ser más efectivo en el cáncer en etapas tardías vs tempranas cuando la estirpe es lobulillar, así como un papel por mucho más potencial en la prevención del cáncer ductal *in situ* para la conversión a carcinoma invasor en tejido que expresa el receptor beta.⁶ Dentro de su revisión encontraron expresión de no más del 10% de receptores beta en las áreas de tejido normal, mientras que el tejido canceroso 80% mostraba expresión para este receptor. En todas las áreas donde se expresó el receptor β 2 estaba lleno de colágeno denso y los núcleos celulares expresaban factor 1 inducible por hipoxia (HIF1A). La expresión del receptor β 2 no está limitada solo a células malignas sino a la zona estromal y células endoteliales. En el cáncer ductal invasor de alto grado no se expresaron receptores alfa ni beta, en el lobular de alto grado se perdió la expresión del receptor beta y la expresión del receptor alfa, mientras que el Ki-67 se mostró muy abundante.⁶

Por otro lado, en relación con la proporción ER α /ER β , también se ha correlacionado con la resistencia a los diferentes tratamientos, no solo hormonales sino citotóxicos. En líneas células donde se tiene una proporción ER α /ER β alta con una sobreexpresión del ER β , se ha visto que la acción del cisplatino (CDDP) se ve incrementada tanto en la apoptosis como en la producción de estrés oxidativo, es decir la sobreexpresión del ER β incrementa la sensibilidad al CDDP por las células.⁹ La inhibición del receptor ER β en la línea celular T47D incrementa la eficacia del tratamiento con tamoxifeno, con aumento en la producción de estrés oxidativo y apoptosis; mientras que en la línea celular MCF-7 la sobreexpresión de ER β mostró una mejor respuesta al tamoxifeno con un incremento en la muerte celular y autofagia. Así mismo Razandi *et al.* en el 2013, evidenciaron que la presencia de ER β en la mitocondria podría mejorar la respuesta al tamoxifeno en el cáncer de mama resistente a este tratamiento.¹⁰

Al-Bader *et al.*¹¹ estudiaron la expresión de distintas variantes de procesamiento del ER α y distintas isoformas del ER β en siete líneas celulares de cáncer de mama, tres de las cuales se conoce que son ER positivos de acuerdo con la literatura (MCF7, T-47D y ZR-75-1), y cuatro se reportan como ER negativos (MDA-MB-231, MDA-MB-453, SK-BR-3 y HCC1954). Los investigadores encontraron que el ER α se expresó en las líneas celulares ER positivos y en algunas líneas ER negativos. Por ejemplo, las variantes 3, 5 y 7 del ER α se expresaron en las líneas celulares MCF7 y T-47D (ER positivos), mientras que las variantes 5 y 7 fueron detectadas en células ZR-75-1 (ER positivos), MDA-MB-231 y HCC1954 (ER negativos). Con respecto al ER β , este grupo demostró que el ER β 1 se expresó en todas las líneas celulares estudiadas, el ER β 2 se expresó en todas las líneas celulares ER positivos y en algunas ER negativos (MDA-MB-231, MDA-MB-453 y SK-BR-3). Las líneas MCF7, ZR-75-1, MDA-MB-453, HCC1954 y T-47D expresaron la variante ER β 5. Esto demuestra que, en estas líneas celulares de cáncer de mama, las cuales son ampliamente utilizadas en investigación y que se conocen como ER negativos, expresan ARN mensajero y proteína correspondientes a genes de receptores estrogénicos alfa y/o beta. Asimismo, pone en evidencia que nuestro entendimiento

sobre la expresión génica de las distintas variantes o isoformas de los receptores estrogénicos a nivel funcional requiere de más investigación.

1.2. Planteamiento del Problema

En el abordaje del cáncer de mama se realiza de forma rutinaria la búsqueda de la expresión de receptores de estrógenos alfa (ER α) y de progesterona, ya que esto no solo es un factor pronóstico, sino que además es un factor predictivo, sin embargo se ha observado que hasta un 30 al 40% de las pacientes que muestran un estatus hormonal positivo no responden al tratamiento endócrino, incluso hasta 10% presentan recaída durante el mismo, de la misma forma se ha observado que pacientes que muestran un estatus hormonal negativo se benefician de tratamiento hormonal.

Lo anterior se ve respaldado por investigaciones mayormente realizadas en líneas celulares de cáncer de mama, donde se ha encontrado que estas líneas a pesar de ser identificadas como ER negativas, expresan RNA mensajero y proteínas correspondientes a genes de receptores alfa y/o beta.

Con base en estas observaciones es posible plantear que las diversas respuestas al tratamiento que se han observado en la práctica clínica y en la literatura pudieran estar influenciadas por la presencia o ausencia de las diferentes isoformas del receptor de estrógeno tipo beta.

El presente estudio es el primero en el que se propone identificar la expresión de las seis isoformas del ER β en tejido tumoral de glándula mamaria, y el primero que se realiza en una población de pacientes mexicanas con diagnóstico de cáncer de mama.

1.3. Pregunta de Investigación

¿Es posible que los tumores de pacientes con cáncer de mama invasor, unilateral, con tratamiento inicial quirúrgico, expresen distintas isoformas del receptor estrogénico tipo beta?

1.4. Justificación

La evaluación de los ER β no se realiza en el abordaje de las pacientes con cáncer de mama, no existe trabajo previo que haya analizado las diversas isoformas de este receptor, ni en tejido fresco congelado, en espécimen de bloques de parafina y/o en líneas celulares. Las isoformas más estudiadas son la β 1 y β 2 sin poder concluir el papel que juega su presencia o ausencia en el desarrollo del cáncer o en la respuesta al tratamiento. Algunos autores han concluido que la expresión de estas isoformas se relacionan como factores de buen pronóstico en tumores de menor tamaño, axilas negativas y tumores de bajo grado; otros han documentado que la presencia de la expresión del receptor beta incrementa la respuesta a los tratamientos con aumento del estrés oxidativo y la apoptosis, esto en líneas celulares, así mismo se ha documentado la expresión de estos receptores en líneas células altamente conocidas con estatus hormonal negativo, por lo que se plantea que las pacientes con perfil molecular triple negativo pudieran beneficiarse de tratamientos hormonales.

Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo identificar la expresión génica de las diferentes isoformas del receptor de estrógeno tipo beta en pacientes con cáncer de mama tratadas inicialmente de forma quirúrgica. Esperamos que una o más de las isoformas de este receptor se expresen en el tejido tumoral, con lo cual se podría justificar la búsqueda dirigida de una o más isoformas por inmunohistoquímica, y finalmente determinar si la presencia o no del ER β tiene un impacto pronóstico o predictivo en el abordaje de las pacientes con cáncer de mama.

1.5. Objetivos

Objetivo General

Identificar el perfil de expresión génica de las isoformas del receptor estrogénico tipo β en pacientes con cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas con cirugía de forma inicial en el Instituto Nacional de Cancerología.

Objetivos Específicos

- 1) Identificar las características demográficas de las pacientes con cáncer de mama cuyo tejido expresa una o más de las isoformas del ER β .
- 2) Identificar las principales características del tumor de las pacientes cuyo tejido expresa una o más de las isoformas del ER β .
- 3)** Estandarizar la metodología para la identificación de la expresión génica de las isoformas del receptor estrogénico tipo beta.

1.6. Hipótesis

Hipótesis de Investigación

El tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas con cirugía de forma inicial, puede expresar una o más de las isoformas del receptor de estrógenos tipo beta.

Hipótesis Nula

El tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, invasor, unilateral, tratadas con cirugía de forma inicial, no expresa las isoformas del receptor de estrógenos tipo beta.

Capítulo 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer de Mama. Generalidades.

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en las mujeres, y la segunda causa de muerte más común a nivel mundial, con una incidencia registrada en el 2012 de 1,671,149 casos y una mortalidad de 521,907. En países en vías de desarrollo se presentaron 883,000 casos nuevos mientras que en los países desarrollados 749,000, con un incremento en la incidencia global anual de 0.5%. En México según el reporte Globocan 2012, se presentaron 20,444 nuevos casos con una mortalidad de 5,680.¹² En el Instituto Nacional de Cancerología, de 2007 a 2013 se reportaron 5,500 nuevos casos de cáncer de mama, de los cuales 4,300 fueron analizados por Mohar et al., quienes encontraron en este grupo, una edad promedio de 52 ±12 años, el 15.3% (645) correspondieron a pacientes menores de 40 años, 41% en sobrepeso y 30% con obesidad. El 48.8% fueron premenopáusicas, 36.6% en etapa II, 36.2% en etapa III, la histología más frecuente correspondió a estirpe ductal en el 85.1% de los casos, grado histológico alto en el 51.3%, y con receptores hormonales positivos y HER-2 negativo en el 60.7%, mientras que los triples negativos se encontraron en el 16%.¹³

Existen diversos factores de riesgo relacionados con la presentación del cáncer de mama, entre éstos podemos mencionar los factores biológicos como el sexo femenino, la edad (a mayor edad mayor riesgo), el antecedente personal o familiar de cáncer de mama, el antecedente de hiperplasia ductal atípica, el carcinoma lobulillar *in situ*, una vida menstrual mayor a 40 años, la densidad mamaria, ser portadora de los genes BRCA1 y BRCA2; factores ambientales como la exposición a radiaciones ionizantes; factores relacionados con el estado reproductivo como la nuliparidad, primer embarazo a término después de los 30 años, el uso de terapia hormonal de reemplazo; y finalmente los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida como la alimentación rica en carbohidratos, baja en fibra, alta en grasas, la presencia de obesidad, el sedentarismo, el consumo de alcohol y el tabaquismo.¹⁴

La asociación del riesgo incrementado de cáncer de mama con niveles hormonales circulantes se ha analizado en diversos estudios, como fue demostrado en un

trabajo publicado en 1997 en el cual se reporta un reanálisis de 51 estudios epidemiológicos que incluyó a 52,705 pacientes con cáncer de mama, y 108,411 pacientes sin cáncer de mama usuarias de terapia hormonal de reemplazo, en la que se demostró un riesgo mayor asociado al uso de la terapia hormonal de reemplazo e incrementado aún más de acuerdo con el tiempo de uso (5 años vs 10 años).¹⁵

Así mismo la asociación del cáncer de mama con el peso de las pacientes ha sido objeto de investigación por múltiples autores, como quedó demostrado en el 2010 por van den Brandt et al.¹⁶, quienes analizaron la grasa corporal y la mala alimentación en pacientes con cáncer de mama, entre sus hallazgos se encuentran una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad, con una asociación positiva del cáncer de mama y el peso en pacientes postmenopáusicas, con riesgo relativo estadísticamente significativo; por ejemplo el riesgo relativo para pacientes de 80 kg o más, comparado con las pacientes de 60 kg o menos fue de 0.58 en pacientes premenopáusicas, mientras que dicho valor fue de 1.25 para pacientes postmenopáusicas, dejando claro que la asociación del peso y el cáncer de mama se establece de acuerdo con el estado menopáusico de la paciente.¹⁶ Lo anterior podría deberse a que en las pacientes obesas postmenopáusicas los niveles de estrógenos se encuentran entre un 50 y 100% más elevados que en las postmenopáusicas con peso normal.¹⁶

El cáncer de mama es una enfermedad muy compleja con características biológicas diversas y responsables de las múltiples presentaciones clínicas y modalidades de tratamiento. El análisis extenso del genoma de las líneas celulares cancerosas de mama ha permitido establecer o identificar subtipos intrínsecos de esta patología, los cuales pueden ser identificados con base en los resultados de pruebas moleculares como PAM-50 o MammaPrint/BluePrint, sin embargo, en la práctica clínica la pregunta no es cómo subdividir este tipo de cáncer de acuerdo con la biología molecular, sino definir qué pacientes se beneficiarán o no de ciertas terapias en particular.¹⁷

2.2. Estadificación del cáncer de mama.

De acuerdo con la AJCC en su 7ª edición, el cáncer de mama se estadifica y se establece su etapa clínica según los criterios que se muestran en las Tabla 1 y 2.¹⁸

Tabla 1. Criterios para la estadificación del cáncer de mama según la AJCC en su 7ª edición.

Tumor primario (T)	
TX	Tumor primario que no puede ser evaluado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis CDIS	Carcinoma ductal in situ
Tis LCIS	Carcinoma lobular in situ
Tis Paget	Enfermedad de Paget no asociado a carcinoma invasor o in situ (CDIS Y/O LCIS) en el parénquima mamario.
T1	Tumor ≤ 20 mm en su mayor dimensión T1mi : tumor ≤ 1 mm en su mayor dimensión T1a : tumor > 1 mm pero ≤ 5 mm en su mayor dimensión T1b : tumor > 5 mm pero ≤ 10 mm en su mayor dimensión T1c : tumor > 10 mm pero ≤ 20 mm en su mayor dimensión
T2	Tumor > 20 mm pero ≤ 50 mm en su mayor dimensión
T3	Tumor > 50 mm en su mayor dimensión
T4	Tumor de cualquier tamaño que se extiende a la pared torácica y/o a la piel (ulceración o nódulos) T4a : extensión a la caja torácica, no incluye solo la adherencia/invasión al musculo pectoral. T4b : ulceración y/o nódulos satelitales ipsilaterales y/o edema (incluye piel de naranja) de la piel, sin cumplir criterios para carcinoma inflamatorio. T4c : ambas T4a + T4b T4d : carcinoma inflamatorio
Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales del nivel I y II. Móviles.
N2	Metástasis en nivel I y II de ganglios linfáticos axilares, clínicamente detectados. Ganglios en la mamaria interna ipsilateral en ausencia de metástasis ganglionares linfáticas axilares por clínica. N2a : metástasis a ganglios linfáticos axilares nivel I y II ipsilaterales, fijo a otra estructura u otras estructuras. N2b: metástasis detectadas únicamente por clínica en la mamaria interna ipsilateral en ausencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares en nivel I y II por clínica.
N3	Metástasis a nivel III axilar, infraclavicular ipsilateral con o sin involucro de ganglios axilares nivel I y II o detectados clínicamente en la mamaria interna con evidencia clínica de metástasis a ganglios axilares ipsilaterales nivel I y II o metástasis a ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin involucro de los ganglios linfáticos de la mamaria interna o axilares. N3a : metástasis a ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales. N3b : metástasis a ganglios linfáticos a la mamaria interna ipsilateral y ganglios axilares. N3c: metástasis a ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales.
Metástasis (M)	
M0	Sin evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia.
cM0(i+)	Sin evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia, no más de 0.2 mm en pacientes sin signos ni síntomas de metástasis.
M1	Metástasis detectable a distancia determinado por clínica o radiológica y/o histológicamente mayor de 0.2 mm.

Tabla 2. Criterios para establecer la etapa clínica del cáncer de mama según el TNM de la AJCC en su 7ª edición.

Etapa Clínica AJCC	Tumor	Ganglios	Metástasis
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

En la revisión más reciente de la AJCC se realizaron cuatro cambios que básicamente se resumen en los siguientes aspectos: 1) Definición del tamaño del tumor. Se solicita que el tamaño del tumor sea lo milimétricamente más cercano posible, 2) Clasificación ganglionar. Se define como ganglio positivo a cualquier ganglio patológico que tenga una metástasis de al menos 0.2 mm o > 200 células neoplásicas. El estado positivo del ganglio es subdividido por cuatro factores: a) el tamaño de la metástasis, b) el ganglio anatómico implicado, c) el total de ganglios positivos y d) el método de detección ya sea por biopsia de tejido, BAAF o detección clínica, y con respecto a este punto, por “detección clínica” la AJCC se refiere a BAAF positiva, examen clínico positivo o hallazgos radiológicos positivos; en cuanto al tamaño de las metástasis, pN1mic se refiere a 0.2 mm (o > 200 células) o hasta 2 mm, y se define como micrometástasis. Más de 2 mm como macrometástasis y se otorgará pN1, pN2 o pN3 de acuerdo con el número de ganglios positivos; por el sitio anatómico: mamaria interna, infraclavicular y supraclavicular; y de acuerdo con el número de ganglios positivos: de uno a tres como pN1, de cuatro a nueve como

pN2 y más de nueve como pN3; se considera ganglio negativo como pN0 o pN0i+, aquel ganglio sin evidencia de tumor metastásico (pN0) o un ganglio con grupos de células tumorales aisladas menores de 0.2 mm cada una o menos de 200 células (pN0i+). 3) Clasificación de metástasis. En este aspecto la AJCC separa el cáncer detectado de forma incidental menor de 0.2 mm, en tejido nodal no regional distante, sin evidencia clínica y/o radiológica de metástasis, por ejemplo, en paciente sometida a ooforectomía profiláctica y que como hallazgo se reporte cáncer menor de 0.2 mm no debe ser manejada como metástasis a distancia pM1 sino como pM0i+ en ausencia de cualquier evidencia clínica y/o radiológica de afectación ovárica. Y, por último 4) Aspectos especiales con respecto a los tejidos de pacientes que reciben terapia neoadyuvante. En este punto la definición de tumor residual posterior a tratamiento neoadyuvante, la AJCC afirma que el ypT se basa en el foco de mayor tamaño de cáncer invasor residual, en caso de haber varios nidos microscópicos se debe basar en el área de mayor contigüidad de carcinoma. No considerar la fibrosis del estroma en el lecho tumoral para incrementar el tamaño.¹⁸

Para establecer el tratamiento en el cáncer de mama, lo podemos dividir de la siguiente forma: 1) Cáncer no invasor puro que incluye el carcinoma lobulillar *in situ*, y el carcinoma ductal *in situ*. 2) Cáncer de mama invasor locorregional operable que corresponde a las etapas I, II y algunos tumores etapa IIIA, 3) Cáncer de mama locorregional no operable correspondiente a las etapas clínicas IIIB, IIIC y algunas etapas IIIA y 4) Enfermedad metastásica o carcinoma recurrente.

En las etapas tempranas las pacientes con cáncer de mama por lo general son sometidas inicialmente a tratamiento quirúrgico, ya sea por cirugía conservadora o mastectomía con o sin radioterapia, seguidos de tratamiento sistémico de acuerdo con las características biológicas del tumor, como es el tamaño, el grado histológico, el involucro ganglionar, el estado de los receptores hormonales de progesterona y estrógenos, así como la expresión del oncogen HER-2.¹⁹

Las limitaciones del tratamiento se definen con base en las características biológicas del tumor como son el tamaño, involucro ganglionar, grado histológico, edad de la paciente, presencia de receptores de estrógenos, de receptores de

progesterona, así como de receptores de factores de crecimiento, aunque en ocasiones estas características no son suficientes ya que tumores con presentación clínica y patológica similar muestran diferente comportamiento.²⁰

2.3. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Se ha observado una diferencia significativa en la sobrevida global de acuerdo con las características biológicas por lo que se ha clasificado al cáncer de mama en los siguientes grupos: tumores con receptores de estrógenos positivos, los cuales se caracterizan por una alta expresión de genes en las células luminales, por lo que este grupo ha sido denominado como grupo luminal; tumores con receptores de estrógenos negativos, grupo que se divide en basal-like, ErbB2 positivo y normal-like. Otro grupo de tumores corresponde a aquellos que se caracterizan por expresar niveles altos del oncogen HER-2, y que muestra bajos niveles de receptores de estrógenos. Se ha observado que los subtipos basal-like y ErbB2-positivo están asociados a periodos más cortos de sobrevida, mientras que los tumores del grupo luminal presentan mejor pronóstico.²⁰

Grupo Luminal. Aproximadamente el 75% de los cánceres de mama son receptores de estrógenos y/o progesterona positivos. El subgrupo luminal A es el más común dentro de este grupo y representa del 50 al 60% de todos los cánceres de mama. Frecuentemente son de bajo grado, con baja actividad mitótica e incluye las histologías: tubular, cribiforme, mucinosa o lobular. Presentan buen pronóstico y altos niveles de receptores de estrógenos con niveles bajos en la expresión de genes relacionados con la proliferación. Por lo tanto, este subgrupo se define por la presencia de receptores de estrógenos positivos y/o receptores de progesterona positivos con HER-2 negativo y Ki-67 bajo por inmunohistoquímica. La recaída es significativamente más baja que en otros subgrupos, la recurrencia es común a hueso, mientras que a hígado, pulmón y sistema nervioso central ocurre en menos del 10%, el tratamiento de este subgrupo se basa principalmente en hormonoterapia.

El subgrupo luminal B representa del 15 al 20%, tiene un fenotipo más agresivo, con grado histológico alto, índice de proliferación alto y de peor pronóstico. También presenta altas tasas de recurrencia y baja supervivencia comparado con el subgrupo luminal A. La principal diferencia entre estos dos subgrupos es la expresión incrementada de genes como v-MYB (avian myeloblastosis viral oncogene homolog), GGH (gamma glutamyl hidrolase), LAPTMB4 (lysosome-associated transmembrane protein 4-beta), NSEP1 (nuclease sensitive element binding protein 1) y CCNE1 (cyclin E1) en el subgrupo luminal B. Aproximadamente el 30% de los tumores HER-2 positivos por inmunohistoquímica son del subgrupo luminal B. También se ha considerado al Ki-67, un marcador de proliferación que podría contribuir a la diferencia entre el subgrupo luminal A y el subgrupo luminal B, y para el cual se ha determinado un punto de corte del 14%, sin embargo, este marcador tiene diversas limitaciones como lo es su baja reproducibilidad interlaboratorios. Con base en lo anterior, el subgrupo luminal B se define por la presencia de receptores de estrógenos positivos, HER-2 negativo y Ki-67 alto, o por la presencia de receptores de estrógenos positivos y HER-2 positivos²⁰.

Grupo HER-2 positivo. Este grupo representa entre el 15 y 20% de los cánceres de mama. Tienen presentaciones clínicas y biológicas más agresivas. Se caracterizan por una alta expresión del gen HER-2, con alta proliferación, el 75% cursan con alto grado histológico y el 40% presentan mutaciones en p53, por lo general son receptores de estrógenos positivos, aunque sus niveles son bajos. Muestran sensibilidad incrementada a agentes citotóxicos y una relativa resistencia a la hormonoterapia, con tendencia a metastatizar a cerebro y órganos viscerales.

Grupo con receptores de estrógenos negativos. Este grupo se subdivide en basal-like, ErbB-2 positivo y normal-like. El subgrupo basal-like representa entre el 8 y 37% de los cánceres de mama, se caracteriza por una pobre diferenciación, alto grado histológico, presentación clínica agresiva y metástasis a cerebro y pulmón. Muestran altos niveles de marcadores mioepiteliales como CK5, CK14, CK17 y laminina. No expresan receptores de estrógenos ni de progesterona, ni el oncogen HER-2 por lo tanto son referidos como triple negativo, sin embargo, los términos

“triple negativo” y “basal-like” no son sinónimos, lo cual ha sido respaldado por diversos estudios en los que se ha encontrado entre un 20 y 30% de discordancia entre sus características. El término triple negativo se define inmunohistoquímicamente por la ausencia de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y de HER-2, mientras que el subgrupo basal-like se define por la expresión de genes con base en un análisis de microarreglos.

En la actualidad es determinante la clasificación molecular del cáncer de mama para definir la modalidad del tratamiento.²⁰

2.4. Factores pronósticos y predictivos.

Se consideran factores pronósticos en el cáncer de mama la edad, la etapa clínica, el estado ganglionar, el tamaño tumoral, el grado histológico, el índice de proliferación, la expresión del HER-2, así como de los receptores de estrógenos y progesterona, siendo estos últimos tres también considerados como factores predictivos.²¹

El cáncer de mama invasor debe ser gradado, y se recomienda por la NCCN se utilice el sistema de Nottingham, conocido también como modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), el cual se basa en las siguientes características: formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y conteo mitótico con una puntuación de 3 a 5 que corresponde a G1 de bajo grado o bien diferenciado, 6 a 7 corresponde a un G2 que es grado intermedio o moderadamente diferenciado, y de 8 a 9 a un G3 que es de alto grado o escasamente diferenciado.^{19,22}

Los receptores de estrógeno y progesterona se recomiendan sean medidos en el cáncer invasor primario y también en las lesiones metastásicas ya que su resultado puede influir en el tratamiento planeado. Tanto en las pacientes premenopáusicas como postmenopáusicas se deben evaluar para identificar a las pacientes que tengan mayor beneficio de la terapia endocrina tanto en cáncer de mama en etapas tempranas como metastásica. Con respecto a la evaluación del HER-2 su expresión y/o amplificación debe ser evaluado en el cáncer de mama primario invasor al

momento del diagnóstico, así como en la recurrencia para guiar la selección del tratamiento adyuvante con trastuzumab.²²

2.5. Receptores de estrógenos.

Los estrógenos son hormonas naturales con un papel importante en la proliferación tanto normal como neoplásica del epitelio mamario.²³ La mayoría de los efectos que producen las hormonas estrogénicas en sus tejidos blanco son mediados por dos clases de receptores nucleares: el receptor estrogénico alfa (ER α), el cual fue clonado por primera vez en 1985 a partir de una línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7),²⁴ y el receptor estrogénico beta (ER β), el cual fue descubierto en tejido prostático de rata en 1996.²⁵

Los genes que codifican para la expresión de estos receptores contienen 8 exones y se localizan en diferentes cromosomas: el gen para el ER α se localiza en el brazo largo del cromosoma 6, mientras que el gen para el ER β se ubica en el brazo largo del cromosoma 14, lo que demuestra que la expresión de cada receptor se da a través de genes independientes.²⁷ Por otro lado, la variación en la expresión de estos receptores en los distintos tejidos del organismo sugiere que cada receptor es mediador de actividades biológicas distintas.^{28,29,30}

En cuanto a la distribución tisular de estos receptores, el ER α se expresa principalmente en órganos sexuales como mama, ovario, útero, testículo y epidídimo; también en otros órganos con metabolismo alto como son corazón, hígado, tracto intestinal, músculo esquelético y tejido adiposo,²³ así mismo en órganos como riñón, glándulas adrenales, glándula pituitaria e hipotálamo. Se ha reportado que este receptor se expresa en el 50 a 80% de los tumores de mama.²⁴ La expresión génica del ER β no predomina en órganos sexuales, éste se localiza en piel, hueso, cerebro, pulmón, vejiga, vasos sanguíneos, linfocitos y tejido adiposo, sin embargo, su papel e impacto en el cáncer de mama continua bajo investigación.^{25,31-32}

En la glándula mamaria la expresión del receptor estrogénico alfa está limitada a las células luminales, pero el receptor estrogénico beta está extensamente distribuido,

tanto en las células epiteliales basales como en las luminales, en los fibroblastos, células adiposas, linfocitos y células endoteliales.³³⁻³⁵

Ambos receptores presentan 6 dominios funcionales similares a los de otros miembros de la superfamilia de receptores esteroideos, los cuales son denominados como regiones A, B, C, D, E y F. Se ha logrado determinar la estructura cristalina de los ER α y ER β pudiéndose establecer que sus dominios de unión al ADN (región C) presentan 12 segmentos con estructura secundaria helicoidal y que conservan un alto grado de homología (96%). Por otro lado, y en relación con el dominio de unión al ligando (región E), estos receptores muestran un 58% de homología. Estas características estructurales de los ER α y ER β sugieren que ambos podrían unirse a los mismos elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y por lo tanto promover la expresión de los mismos genes blanco, pero presentarían diferente especificidad de ligando.²⁵ La unión del ligando a su receptor induce cambios conformacionales en el complejo receptor-ligando lo que provoca el reclutamiento de proteínas que actúan como co-activadores o co-represores para un adecuado control de la transcripción génica.³⁶

Se conocen dos mecanismos a través de los cuales los receptores estrogénicos alfa y beta pueden mediar la transcripción génica. Por un lado, la unión del complejo receptor-estrógenos a los sitios del ADN denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE), da como resultado el reclutamiento de diversas proteínas incluyendo a la RNA polimerasa, para el correcto inicio de la transcripción de uno o varios genes blanco; por otro lado, está la vía en la que participa AP1, un conocido e importante factor de transcripción nuclear que participa en la inducción de respuesta de factores de crecimiento.^{2,37-39}

Diversos estudios han demostrado que estos receptores presentan distintas afinidades por algunos ligandos. El ER α tiene una mayor afinidad por el estradiol (E2) que el ER β . Se ha calculado una constante de disociación para E2 de 0.06 nM para el ER α , y de 0.24 nM para el ER β . El ER β puede unir otros ligandos con una afinidad mayor que el ER α , como el 4-hidroxitamoxifeno, el fitoestrógeno genesteína, y algunos derivados de la testosterona.²⁵ También se han identificado

novedosos ligandos que actúan como estrógenos selectivos o anti-estrógenos para ambos tipos de receptores.⁴⁰

El ER α es el receptor principal para la función estrogénica de la mama y es esencial en la homeostasis normal de la glándula. La activación del ER α puede inducir el ciclo celular y la estimulación del crecimiento celular, lo que puede conllevar al desarrollo del cáncer.⁴¹ Clínicamente la evaluación de la expresión de los receptores estrogénicos alfa en el cáncer de mama es esencial para determinar el tratamiento, sin embargo la respuesta a la hormonoterapia no puede ser exactamente predicha por el estado de los ER α , se ha observado que el 60% de estos tumores responden a la hormonoterapia, sin embargo menos del 10% de los tumores con receptores estrogénicos alfa negativos también responden a este mismo tratamiento,²⁸ y 10% del 60% que inicialmente responden, presentan recaída.²⁹

Por otro lado, la función de los ER β no está bien establecida, múltiples estudios en líneas celulares han demostrado que la presencia de estos receptores disminuye la proliferación *in vitro* y previene la formación de tumores en respuesta al estradiol, sin embargo otros estudios han demostrado una disminución del crecimiento tumoral al disminuir la expresión del factor de crecimiento endotelial y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, por lo que el papel de estos receptores no es claro.⁴²

En 1997 Dotzlaw *et al.*, fueron los primeros en demostrar la expresión de receptores estrogénicos β en 40 biopsias de glándula mamaria, tanto en tejido mamario normal como en neoplásico.⁴³ Omoto *et al.* en una serie de 88 pacientes con cáncer de mama demostraron que los tumores con receptores de estrógenos tipo β positivos mostraban un mejor pronóstico en comparación con los tumores β negativos.²⁸ Vladusic *et al.*, en su estudio publicado en 1998, describieron la expresión de las variantes del mRNA de los receptores β en líneas celulares de cáncer de mama, especulando que la expresión de delecciones en este tipo de receptores podría contribuir a la progresión del cáncer, incluso señala que la expresión de este receptor en pacientes con cáncer de mama podría interferir en la respuesta a la

hormonoterapia en pacientes con receptores estrogénicos alfa positivos, es decir, contribuye a la resistencia hormonal.²⁹ Otros estudios clínicos han demostrado que la presencia del ER β en cáncer de mama está relacionado significativamente con un buen pronóstico y que la expresión de este receptor tiende a disminuir durante la progresión.¹ Por otro lado, un análisis multivariado de 442 cánceres de mama invasivos tratados con tamoxifeno como adyuvante demostró que el receptor estrogénico β 1 es un predictor independiente de recurrencia y mortalidad especialmente en pacientes triple negativo. Sin embargo, a pesar de que ciertos estudios han relacionado la sobreexpresión del receptor estrogénico β con un incremento en la sensibilidad a la respuesta con terapia hormonal a base de tamoxifeno,⁴⁴ en el 2015 Pons *et al.*, publicaron un trabajo en el que demuestran que la presencia del ER β juega un papel importante en la respuesta a los agentes citotóxicos como cisplatino y tamoxifeno.⁹

2.6. Variantes del receptor estrogénico beta.

Se han identificado distintas isoformas del receptor estrogénico beta, las cuales se generan por variaciones en el procesamiento de los transcritos primarios durante la expresión del ER β 1, conocido como receptor tipo silvestre.⁴⁵⁻⁴⁷ Estos procesamientos alternativos (deleción de exones, inserción o procesamiento del extremo carboxilo terminal) permiten explicar la formación de las isoformas que hoy conocemos como ER β 2, ER β 3, ER β 4 y ER β 5.⁴⁵ Así por ejemplo, ER β 2 (también llamado ER β cx) se diferencia de ER β 1 únicamente en que el exón 8 es reemplazado por una secuencia única de 26 aminoácidos. Hoy se sabe que la expresión del RNA mensajero del ER β 2 se encuentra incrementada en tejido tumoral de glándula mamaria, en relación con la expresión del ER β 1,⁴⁸⁻⁴⁹ lo que pudiera indicar que esta variante (ER β 2) tendría una función específica en la iniciación o desarrollo del cáncer de mama. Sin embargo, las implicaciones clínicas de la sobreexpresión de la variante ER β 2 no son del todo claras, a pesar de que algunos estudios señalan que el incremento en su expresión correlaciona con un pobre pronóstico en cáncer de próstata.⁵⁰

Algunas de estas variantes, como ER β 2 y ER β 5, se encuentran incrementadas durante el crecimiento y progresión del cáncer de mama. Los niveles de RNA mensajero, producto de la expresión génica de estas isoformas, son superiores a los niveles de RNA mensajero de la variante tipo silvestre (ER β 1). Sin embargo, la significancia de la expresión de las proteínas respectivas y su función no se conoce del todo.⁴

Mediante técnicas de transcripción reversa acoplada a PCR se ha logrado detectar RNA mensajero del ER β 2 en una gran variedad de tejidos, siendo el tejido testicular el que muestra una mayor abundancia de esta variante.^{45,51} Por su parte, las variantes ER β 4 y ER β 5 también se han encontrado expresadas en testículo, ovario y otros tejidos, así como en diversas líneas celulares. En los tejidos estudiados, con excepción del testículo, la expresión de la variante ER β 4 es considerablemente más baja que la expresión de la isoforma ER β 5.⁴⁵

Con base en la presencia de uno o ambos tipos de receptores en cierto tejido, pueden formarse homodímeros (ER α -ER α o ER β 1-ER β 1) o heterodímeros (ER α -ER β 1).^{2,52} Cowley *et al.* en 1997 demostraron que la afinidad de los dímeros ER α -ER α y ER α -ER β 1 por los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA es mayor que la afinidad que muestran los dímeros ER β 1-ER β 1, requiriendo en estos casos la unión del ligando para que los complejos receptor-ligando puedan interactuar con los ERE en el DNA.² Sin embargo, ER β 2 puede formar heterodímeros con ER α o ER β 1 sin la necesidad de unirse con su ligando, pudiendo inhibir la unión de ER α y ER β 1 a los ERE. Esto plantea la posibilidad de que ER β 2 actúe como un modulador funcional de ER α y ER β 1.³

Si bien se desconoce el grado de expresión de estos receptores en el tejido mamario normal, se sabe que la expresión génica del ER α está incrementada en el cáncer invasivo de la glándula mamaria, mientras que el ER β lo está en tejido mamario normal. Se ha sugerido que existen cambios en la expresión génica de los receptores estrogénicos ER β 1, ER β 2 y ER β 5 durante los inicios del desarrollo del cáncer, con predominio en la expresión de los ER β 2 y ER β 5. Por otro lado, se ha propuesto que la expresión del ER β 1 tiene una relación inversa con el nivel de

malignidad del tumor y el grado de inflamación, mientras que el ER β 2 se eleva significativamente con el grado de infiltración de linfocitos en el tejido tumoral.⁴

Diversos estudios han investigado la posible asociación entre los niveles de RNA mensajero del ER β con algunos parámetros clínicos del cáncer de mama. Aunque sigue siendo motivo de controversia, la mayoría de los reportes señalan que un incremento en la expresión del gen del ER β 1 se correlaciona significativamente con un buen pronóstico, y que la expresión tiende a disminuir durante la progresión de esta enfermedad,^{1,5-8} por ejemplo, Järvinen *et al.* en el 2000 publicaron un análisis de 92 especímenes de pacientes con cáncer de mama de los cuales 55 tumores presentaban positividad para el ER β , y éstos a su vez se relacionaban de forma estadísticamente significativa con ganglios negativos, bajo grado histológico y pacientes en estado premenopáusico, por lo que Järvinen *et al.* concluyeron que los tumores ER β positivos se asocian con características biológicas menos agresivas, que responderían mejor a la terapia hormonal y que el ER β podría ser un factor predictivo independiente.¹

La evaluación de los ER β no se realiza en el abordaje de las pacientes con cáncer de mama, únicamente se determina la presencia de los ER α ²⁶, por lo que este trabajo tiene como objetivo identificar la expresión génica de las isoformas del receptor de estrógeno tipo beta en pacientes con cáncer de mama tratadas inicialmente de forma quirúrgica. Esperamos que una o varias de las isoformas de este receptor se expresen en estos tumores, con lo cual podremos justificar en una investigación posterior la búsqueda intencionada de esa o esas isoformas por inmunohistoquímica, y finalmente determinar si la presencia o no del receptor estrogénico β tiene un impacto pronóstico o predictivo en el abordaje de las pacientes con cáncer de mama.

Capítulo 3

METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

Estudio descriptivo, retrospectivo.

3.2. Población de Estudio

Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama tratadas de forma inicial con cirugía, del 01 de enero al 31 de diciembre de 2012, en el Instituto Nacional de Cancerología.

3.3. Selección y Tamaño de la Muestra

Se incluyeron todas las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor, unilateral, en etapa temprana o localmente avanzada, tratadas de forma inicial con cirugía, del 01 de enero al 31 de diciembre de 2012 en el Instituto Nacional de Cancerología, que cumplieron con los criterios de selección.

3.4. Método de Muestreo

Muestreo no probabilístico.

3.5. Instrumento para la Recolección de Datos

Se elaboró un formato en excel para la recolección de los datos sociodemográficos de las pacientes, así como para la recolección de las características patológicas.

3.6. Criterios de Selección

3.6.1. Criterios de Inclusión

- Pacientes femeninas con diagnóstico de cáncer de mama unilateral invasor en etapa temprana o localmente avanzada, tratadas de forma inicial con cirugía, del 01 de enero al 31 de diciembre de 2012, en el Instituto Nacional de Cancerología.

- Pacientes de las que se conserve tejido en bloque de parafina suficiente (2-3 cortes de 10 μm) y en condiciones adecuadas para el análisis de la expresión génica de las isoformas del receptor ER β .

3.6.3. Criterios de Eliminación

- Pacientes que no cuenten con la información completa en el expediente electrónico y/o físico.
- Pacientes con pérdida de seguimiento.
- Pacientes en los que la calidad de la muestra de ácidos nucleicos no sea adecuada para su estudio

3.7. Descripción de las Variables

3.7.1. Variables Independientes

Cáncer de mama

Definición conceptual: Tumor maligno que se desarrolla a partir de células mamarias como resultado de mutaciones o cambios anómalos en los genes que regulan el crecimiento celular.

Definición operacional: El diagnóstico de cáncer de mama se obtendrá a partir del reporte histopatológico del expediente físico o electrónico.

Tipo de variable: Cualitativa dicotómica.

Escala de medición: Nominal.

Nivel de medición: Presente o ausente.

Edad

Definición conceptual: Años cumplidos desde el nacimiento hasta el día del inicio del tratamiento.

Definición operacional: Se registrará la edad en años referida en el expediente clínico al momento del inicio de tratamiento.

Tipo de variable: Cuantitativa discreta.

Escala de medición: De Razón.

Nivel de medición: Años

Tipo de cirugía

Definición conceptual: Procedimiento quirúrgico realizado para la extirpación del tumor.

Definición operacional: El tipo de cirugía se obtendrá a partir del reporte de la nota postquirúrgica realizada por el cirujano y registrada en el expediente electrónico y/o físico del Instituto en la sección de notas médicas.

Tipo de variable: Cualitativa politómica.

Escala de medición: Nominal.

Nivel de medición: Cirugía conservadora, cirugía conservadora más ganglio centinela, cirugía conservadora más disección radical de axila, mastectomía total simple, mastectomía total simple más ganglio centinela, mastectomía radical modificada.

Estadio clínico

Definición conceptual: Clasificación clínica para definir la extensión anatómica del tumor.

Definición operacional: Se determinará con base en los hallazgos clínicos, reportes de patología y estudios de imagen obtenidos a partir del expediente clínico y/o físico; el estadio clínico se catalogará con base en el TNM de la AJCC de la 7ma. edición.

Tipo de variable: Cualitativa politómica.

Escala de medición: Ordinal.

Nivel de medición: 0, I (IA, IB), II (IIA, IIB), III (IIIA, IIIB, IIIC), IV.

Tipo histológico

Definición conceptual: Clasificación de la estructura microscópica que presentan las células.

Definición operacional: Se determinará a partir del reporte del Servicio de Patología y del Servicio de Patología Quirúrgica del Instituto, obtenidos del expediente electrónico y/o físico del paciente.

Tipo de variable: Cualitativa politómica.

Escala de medición: Nominal.

Nivel de medición: ductal, lobulillar, mixto, mucinoso, medular, papilar, apocrino.

Perfil molecular del tumor

Definición conceptual: Clasificación o agrupación del cáncer de mama con base en las características biológicas del tumor (expresión de RE, RP, HER-2, Ki67).

Definición operacional: Se obtendrá de los reportes del Servicio de Patología y del Servicio de Patología Quirúrgica del Instituto, los cuales se encuentran en el expediente electrónico y/o físico del paciente.

Tipo de variable: Cualitativa politómica.

Escala de medición: Nominal.

Nivel de medición: Luminal A, Luminal B, Triple Negativo, HER-2 sobreexpresado.

Sitio de recurrencia

Definición conceptual: Aparición de la enfermedad en un sitio donde no se originó.

Definición operacional: El sitio anatómico de recurrencia se obtendrá del expediente clínico electrónico y/o físico del paciente.

Tipo de variable: Cualitativa politómica.

Escala de medición: Nominal.

Nivel de medición: sin recurrencia, local, ganglionar, pulmón, ósea, hígado, SNC.

3.7.2. Variables Dependientes

Sobrevida global

Definición conceptual: Periodo que transcurre a partir del diagnóstico o de haber iniciado un tratamiento hasta el último control realizado o el fallecimiento del paciente, independientemente de la causa de muerte.

Definición operacional: Tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de tratamiento de la paciente y la fecha registrada de muerte o fecha de última visita en caso de pacientes pérdidas o vivas al momento del análisis

Tipo de variable: Cuantitativa continua

Escala de medición: De razón

Nivel de medición: Meses

Supervivencia libre de recurrencia

Definición conceptual: Periodo que transcurre después de terminar un tratamiento para el cáncer durante el que el paciente sobrevive sin signos o síntomas de la enfermedad.

Definición operacional: Tiempo transcurrido entre el término del tratamiento de la paciente y la fecha registrada de la recurrencia de la enfermedad.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: De razón

Nivel de medición: Meses.

Expresión génica de los receptores tipo beta (ER β 1, ER β 2, ER β 3, ER β 4, ER β 5 y ER β 6)

Definición conceptual: Proceso mediante el cual los genes de los ER β son transcritos a RNA y éstos a su vez procesados y traducidos a una estructura proteíca.

Definición operacional: Cuantificación de RNA mensajeros por PCR en tiempo real para cada uno de los ER β presentes en una muestra de tejido de cáncer de mama.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Escala de medición: De Razón.

Nivel de medición: Unidades relativas de expresión.

3.8. Procedimientos

3.8.1. Obtención de Muestras de Tejido tumoral.

A partir del total de pacientes valoradas de primera vez en el Instituto Nacional de Cancerología del 01 de enero al 31 de diciembre del 2012, se identificó nuestra población de estudio: pacientes femeninas con diagnóstico de cáncer de mama en etapa temprana o localmente avanzada. Posteriormente se eliminaron todas aquellas pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante (quimioterapia, radioterapia u hormonoterapia).

Una vez identificadas las pacientes con dicho diagnóstico y con tratamiento quirúrgico inicial se revisó en el Servicio de Patología del Instituto Nacional de

Cancerología si se contaba con tejido suficiente en bloques de parafina para el análisis: 2-3 cortes de 10 μm .

Las muestras de tejido canceroso provenientes de pacientes que cumplieron con los criterios de selección, fueron agrupadas según la clasificación del tumor con base en su perfil molecular en: luminal A, luminal B, triple negativo, y con sobre-expresión del oncogen HER-2.

3.8.2. Identificación de la Expresión Génica de las Isoformas del ER β

La metodología para la evaluación de la expresión génica de las isoformas del receptor estrogénico tipo beta a partir de tejido pacientes con cáncer de mama conservado en cuadros de parafina, fue la siguiente:

Obtención de RNA total a partir de la muestra de tejido tumoral.

Se obtuvo una muestra de 20 μm de tejido canceroso conservado en parafina, el cual fue cortado con un micrótopo y colocado en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL de capacidad. La muestra de tejido fue desparafinada para lo cual se colocó en una solución amortiguadora conteniendo xilol y se incubó a 50 °C durante 2 horas. El tejido desparafinado se colocó en una solución amortiguadora de lisis conteniendo Proteinasa K y se incubó a una temperatura entre 50 y 90 °C durante 2 horas.

Para la obtención del RNA total se utilizó un kit comercial de extracción (FFPE RNA/DNA Purification Plus kit, Norgen Biotek Corp., CAN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit utiliza columnas de extracción para la obtención y purificación del RNA total.

La concentración del RNA extraído se determinó mediante un espectrofotómetro de microplaca (Epoch, Biotek, USA) a 260 nm, y la pureza a través del cociente de las lecturas a 260 y 280 nm (Abs a 260/Abs a 280). La integridad del material obtenido fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con solución amortiguadora TAE 1X. Finalmente el RNA obtenido de cada muestra fue almacenado -20 °C hasta su posterior uso.

Síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído.

La síntesis de cDNA se realizó partiendo de 500 ng de RNA total. Este procedimiento se llevó a cabo mediante la reacción de la transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” (Applied Biosystems, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En las Tabla X y Y se muestra la composición de la mezcla de reacción y las condiciones de reacción en el termociclador, respectivamente.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA mediante la RT-PCR.

Componentes para la RT-PCR	Volumen (μ L)
10X RT Amortiguador	2
25X dNTPs (100 mM)	0.8
10X Random primers	2
cDNA (500ng)	10
Transcriptasa reversa MultiScribe	1
H ₂ O libre de nucleasas	4.2
Volumen total	20

dNTPs=Desoxirribonucleótidos, cDNA=DNA complementario

Tabla 4. Condiciones de reacción para la síntesis de cDNA mediante la RT-PCR.

Condiciones del Termociclador				
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (Min.)	10	120	5	∞

La concentración del cDNA sintetizado se determinó mediante un espectrofotómetro de microplaca (Epoch, Biotek, USA) a 260 nm, y la pureza a través del cociente de las lecturas a 260 y 280 nm (Abs a 260/Abs a 280). Finalmente, este material fue almacenado a -20 °C para ser utilizado en las PCR punto final y PCR cuantitativo (qPCR o PCR en tiempo real).

Diseño de los oligonucleótidos (primers) para el análisis de expresión génica.

Esta sección fue crucial para el desarrollo de la presente investigación ya que se sabe que la diferencia en las secuencias entre las diferentes isoformas es muy pequeña. Se realizó una búsqueda de las secuencias de las diferentes variantes reportadas a nivel de RNA mensajero en las bases de datos del GenBank (Anexo A) “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”. En esta misma plataforma NCBI/Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi>) fueron diseñados los oligonucleótidos, tomando en cuenta las siguientes consideraciones: 1) Se identificaron las regiones no compartidas entre las diferentes isoformas ubicadas hacia la región 3´; 2) el par de oligonucleótidos seleccionado para cada isoforma no amplificó fragmentos mayores a 250 pares de bases (pb), con la finalidad de poder usarlos para la PCR punto final y PCR cuantitativa; 3) La ubicación de la zona de hibridación en el cDNA molde incluyó regiones inter-exónicas para garantizar que solo se reconozca el RNA mensajero maduro y disminuir las probabilidades de reconocimiento de la secuencia del DNA genómico; 4) Las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados fueron probadas en análisis computacionales de “PCR-in silico” (<http://rohshdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr>) para comprobar la especificidad para cada isoforma, así como para calcular la temperatura de alineamiento óptima; 5) Con base en todas estas especificaciones, los oligonucleótidos seleccionados fueron sintetizados por la compañía Integrated DNA Technologies (IDT, CA, USA).

Los oligonucleótidos sintetizados, los cuales se muestran en la Tabla 3, fueron reconstituidos para obtener una solución stock a una concentración de 100 μ M, la cual fue diluida 1:10 para generar una solución de trabajo 10 μ M. Los oligonucleótidos reconstituidos fueron almacenados a -20°C.

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada una de las isoformas de los REβ. Se incluyen las respectivas temperaturas de fusión (T_m).

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Temperatura (T _m)
HsmRNA_ERB_1	Forward primer GTCAGGCATGCGAGTAACAA Reverse primer GGGAGCCCTCTTTGCTTTTA	59°C
HsmRNA_ERB_2	Forward primer TCTCCTCCCAGCAGCAAT CC Reverse primer GGT CAC TGC TCC ATC GTT GC	60.2°C
HsmRNA_ERB_3	Forward primer ATGTACCCTCTGGTCACAGC Reverse primer GCTTTTCTCCCCATCTCGCAT	60°C
HsmRNA_ERB_4	Forward primer GTG ACC GAT GCT TTG GTT TG Reverse primer ATC TTT CAT TGC CCA CAT GC	60°C
HsmRNA_ERB_5	Forward primer GAT GCT TTG GTT TGG GTG AT Reverse primer CCT CCG TGG AGC ACA TAA TC	60.2°C
HsmRNA_ERB_6	Forward primer CATCTCCTCCCAGCAGCAAT Reverse primer	58.5°C

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación de los oligonucleótidos sintetizados para cada isoforma, se realizaron PCRs utilizando diferentes temperaturas de alineamiento y con la ayuda de cDNA de líneas celulares como controles positivos de expresión para cada par de oligonucleótidos. El producto de la amplificación fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando como amortiguador de corrida TBE 1X y teñidos con bromuro de etidio. El patrón electroferético (tamaño de los fragmentos obtenidos en relación con los esperados) fue analizado mediante un fotodocumentador equipado con una lámpara de luz UV (GelDoc, Bio-Rad).

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR o PCR en tiempo real).

Se evaluó la expresión relativa de cada RNA mensajero de las isoformas del ER β en las muestras de tejido canceroso mediante la técnica de PCR en tiempo real, para lo cual se consideraron las condiciones de alineamiento previamente establecidas para cada par de oligonucleótidos. Para la qPCR se utilizaron 800 ng de cDNA de cada muestra, un kit comercial de amplificación “Luminaris color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), así como un termociclador Light Cycler 480 Instrument II (Roche - Mannheim, Germany).

Para cada ensayo se utilizaron muestras por duplicado. Los datos fueron normalizados con el valor de expresión del gen constitutivo de β -actina (Housekeeping). El análisis de los datos se realizó mediante el método comparativo de Ct, el cual se basa en las características de la fase exponencial de la curva sigmoide de emisión de fluorescencia ($\Delta\Delta Ct$) para cuantificar el nivel de expresión, la cuantificación relativa fue calculada como la $2^{-\Delta\Delta Ct}$ respecto al gen normalizador.

3.9. Análisis de datos

Las variables de interés se analizaron mediante estadística descriptiva. Para obtener las diferencias de expresión de las distintas isoformas del ER β se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, con un valor de $P < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico Prism 6.

3.10. Aspectos Éticos, Normativos y de Seguridad

El presente estudio se desarrolló, hasta su conclusión, en apego a las disposiciones legales de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; a la legislación aplicable en materia de protección al ambiente como la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

El proyecto se sometió a consideración del Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cancerología de México, asignándosele el número de seguimiento INCAN/CI/478/17. (Anexo B)

Capítulo 4

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. RESULTADOS

Se incluyeron un total de 40 tejidos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor, unilateral, vistas por primera vez durante el periodo del 01 de enero 2012 al 31 de diciembre del 2012, tratadas de forma inicial con cirugía, con muestras de tejido tumoral conservadas en bloques de parafina aptas para ser analizadas. La edad promedio de las pacientes fue de 54 años con un rango de 29 a 73 años, con un IMC promedio de 28.38 ± 5.45 kg/m². Participaron 17 pacientes premenopáusicas, 23 postmenopáusicas, afectando principalmente la glándula mamaria derecha, el tamaño del tumor clínicamente en promedio fue de 21.01 ± 13.68 mm, 21 pacientes correspondieron a etapa IA, 15 a IIA y 4 a IIB; la axila por detección clínica fue positiva en 11 pacientes de las 40. Sometidas a un procedimiento conservador fueron 29 pacientes y a mastectomía 11. Estos datos se muestran en la Tabla 6.

Con respecto a las características patológicas el tamaño promedio de los tumores fue de 20.85 ± 9.36 mm, con axila patológica positiva a macrometástasis en 13/40; por etapas patológicas, 16 fueron IA, 17 IIA y 5 IIB, mientras que 2 fueron etapa IIIA. La estirpe más frecuente fue el ductal (38/40), el grado histológico más frecuente fue el G2 (17/40), presentaron permeación linfovascular 14 pacientes, receptores de estrógeno más de 20% en 36 pacientes y receptores de progesterona más de 40% en 28 pacientes. El HER-2 se sobreexpresó en 6 pacientes, de acuerdo con los perfiles moleculares 34 fueron luminal, 6 resultaron con HER2 sobreexpresado y en ningún caso se obtuvo triple negativo. Esta información se muestra en la Tabla 7.

Tabla 6. Características sociodemográficas y clínicas de las pacientes.

Característica	Resultado
Antropométricas	
Edad (años)	54 (29-73) [§]
IMC (kg/m ²)	28.38 ± 5.45*
Estado Hormonal	
Premenopáusicas	17
Postmenopáusicas	23
Glándula mamaria afectada	
Derecha	27
Izquierda	13
Tamaño tumor clínico (mm)	21.01 ± 13.68*
Etapa Clínica	
IA	21
IIA	15
IIB	4
Axila	
Positiva	11
Negativa	29
Procedimiento Quirúrgico	
CC + GC	25
CC + DRA	4
MT + GC	4
MT+ GC + DRA	4
MRM	3
Adyuvancia	
HT	5
HT + QT	4
HT + QT + TRASTUZUMAB	3
RT + HT	19
RT + HT + QT	6
RT + HT + QT + TRASTUZUMAB	1
RT + QT + TRASTUZUMAB	1
RT + HT + SOB	1

[§]Media y entre paréntesis el rango, *Media ± desviación estándar, El resto de los valores representa número de pacientes.

Tabla 7. Características patológicas de los tumores.

Característica	Resultado
Tamaño tumor patológico (mm)	20.85±9.36*
Axila patológica	
Macrometástasis	13
Micrometástasis	0
Negativa	27
Etapas patológicas	
IA	16
IB	0
IIA	17
IIB	5
IIIA	2
IIIB	0
IIIC	0
Estirpe	
Ductal	38
Lobulillar	2
Escala de Scarf-Bloom-Richardson (SBR)	6.6±1.53*
Grado Histológico	
G1	9
G2	17
G3	14
Permeación Linfovascular (PLV)	10
Infiltrado Linfoplasmacitario (ILP)	9
Receptores Estrogénicos	
≤20 %	4
>20 %	36
Receptores de Progesterona	
≤40 %	12
>40 %	28
Sobre-expresión de HER-2	
Negativo	34
Positivo	6
Ki-67	
≤20 %	33
>20 %	7
Perfil molecular por grupos	
Luminal	34
HER2 sobreexpresado	6
Triple negativos	0

*Media ± desviación estándar. El resto de los valores representan número de pacientes.

Todas las pacientes fueron seguidas durante al menos 48 meses, tiempo en el cual se presentaron 4 recurrencias: una local, dos locorregional y una a distancia con una muerte (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado del seguimiento a 48 meses con respecto a la recurrencia, periodo libre de enfermedad (PLE) y sobrevida global (SG).

Seguimiento a 48 meses	
Recurrencias	n
Local	1
Locorregional	2
Distancia	1
Muerte	1
PLE (meses)	51±7*
SG (meses)	62.54±3.82*

*Media ± desviación estándar.

Para obtener el perfil de expresión de las isoformas más frecuentes, así como los niveles de expresión relativa de cada una de las isoformas del receptor beta de estrógenos en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, obtuvimos el RNA total de las muestras incluidas en parafina de 5 años de almacenamiento para en ellas evaluar los niveles de expresión a nivel del RNA mensajero por medio de PCR cuantitativa (RT-qPCR) de las 6 isoformas reportadas para el receptor estrogénico tipo beta: ER-β1, ER-β2, ER-β3, ER-β4, ER-β5, y ER-β6. El valor de $\Delta\Delta Ct$ obtenido para cada una de las isoformas respecto a la expresión relativa del gen de la beta actina mostraron diferencias en los niveles de expresión de cada una de las isoformas en las diferentes muestras evaluadas, así como entre las isoformas, demostrando que los oligonucleótidos diseñados son capaces de discriminar entre las diferentes variantes a nivel del RNA mensajero (Figura 1 y Tabla 9).

Figura 1. Niveles de expresión de las isoformas del receptor estrogénico tipo beta.

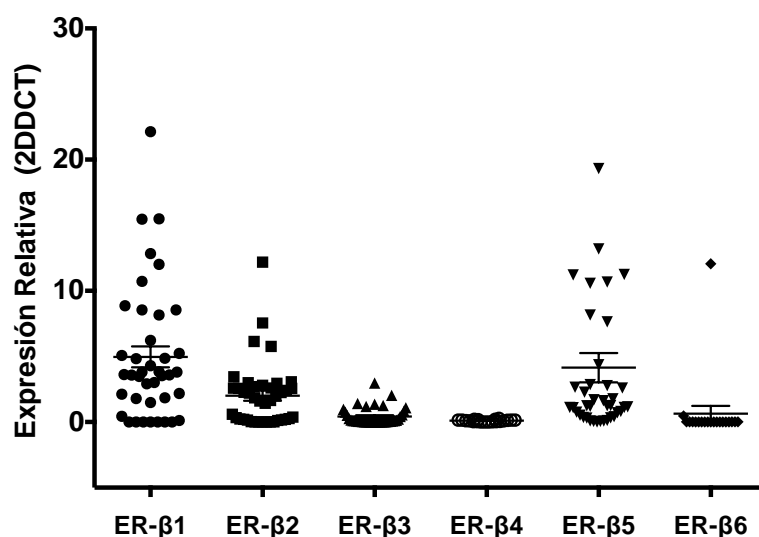


Tabla 9. Resultados de la expresión relativa de las isoformas del REβ en la población estudiada.

Isoforma del ERβ	Positivos N (%)	Promedio de la Expresión Relativa
β1	31 (77)	6.38
β2	23 (57)	3.37
β3	12 (30)	1.25
β4	0 (0)	0.05
β5	26 (65)	6.20
β6	2 (5)	6.26

Tabla 10. Nivel promedio de expresión de las isoformas del Erb por perfil molecular del tejido tumoral. Los valores están expresados en Unidades Relativas de Expresión.

Perfil Molecular	n	ER_β1	ER_β2	ER_β3	ER_β4	ER_β5	ER_β6
HER2	6	8.68	2.17	0.70	0.09	7.19	0.08
Luminal B	5	2.91	0.82	0.65	0.04	0.66	0.00
Luminal A	29	4.55	2.18	0.55	0.05	4.12	0.42
Triple Negativo	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA

SE= Sobre-expresado, NA: No aplica

Tabla 11. Resultados por paciente de la expresión génica de las distintas isoformas del ERβ. Los resultados están expresados en Unidades Relativas de Expresión.

Relación de muestras positivas/negativas								# isoformas
Orden	No. Muestra	ER_B1	ER_B2	ER_B3	ER_B4	ER_B5	ER_B6	
1	5	15.46	5.77	0.11	0.01	0.00	0.00	
2	14	8.55	6.14	0.02	0.09	2.65	0.01	3.00
3	15	3.02	0.00	0.22	0.09	0.76	12.06	2.00
4	22	5.24	1.84	0.00	0.10	0.81	0.01	2.00
5	25	10.72	0.00	0.08	0.15	2.60	0.01	2.00
6	28	3.83	2.58	0.01	0.21	19.33	0.02	3.00
7	29	3.58	0.01	0.00	0.02	2.29	0.00	2.00
8	34	12.02	0.02	1.36	0.01	0.13	0.00	2.00
9	39	4.83	2.70	1.41	0.04	1.10	0.00	4.00
10	41	2.92	0.00	0.43	0.14	1.12	0.01	3.00
11	47	2.18	3.07	0.02	0.04	0.32	0.00	2.00
12	49	2.13	2.57	0.16	0.15	10.69	0.01	3.00
13	62	4.29	1.61	1.26	0.01	0.05	0.00	3.00
14	65	1.85	2.96	1.08	0.15	1.24	0.01	3.00
15	66	3.81	2.79	0.56	0.15	7.63	0.01	3.00
16	71	3.53	0.00	0.52	0.04	1.24	0.00	2.00
17	77	3.47	2.42	2.03	0.03	4.37	0.00	4.00
18	94	1.78	2.57	0.13	0.20	1.63	0.02	3.00
19	96	5.08	2.06	2.97	0.17	1.78	0.47	5.00
20	97	8.55	0.04	0.96	0.29	1.16	0.02	3.00
21	1	0.13	0.12	0.92	0	0.07	0.00	1.00
22	4	3.62	0.27	0.83	0	0.708	0.00	1.00
23	6	0.01	2.99	0.13	0	1.255	0.00	2.00
24	10	8.15	0.34	0.79	0	11.255	0.00	2.00
25	12	0.01	7.56	0.01	0	11.216	0.00	2.00
26	13	12.84	12.19	0.00	0	1.708	0.00	3.00
27	35	0.00	0.21	0.86	0	2.765	0.00	1.00
28	16	0.00	0.16	0.90	0	0.086	0.00	0.00
29	24	1.49	1.43	0.37	0	0.314	0.00	2.00
30	26	0.01	0.38	0.77	0	1.115	0.00	1.00
31	30	4.87	1.64	0.32	0	0.411	0.00	2.00
32	38	22.12	0.21	0.86	0	1.195	0.00	3.00
33	44	0.43	0.15	0.90	0	0.045	0.00	1.00
34	48	15.48	2.22	0.22	0	37.207	0.00	3.00
35	51	3.59	3.45	0.09	0	13.2	0.00	3.00
36	56	0.00	2.25	0.21	0	0.352	0.00	1.00
37	58	3.80	0.24	0.85	0	0.524	0.00	2.00
38	84	8.86	2.26	0.21	0	8.154	0.00	3.00
39	72	6.22	0.60	0.66	0	10.574	0.00	2.00
40	80	0.01	2.60	0.17	0	2.853	0.00	2.00
PROM		4.96	2.01	0.58	0.05	4.15	0.32	

POSITIVO
NEGATIVO

4.2. DISCUSIÓN

Sabemos el importante papel que juegan los estrógenos en el cáncer de mama, actualmente los manejos de las pacientes en su mayoría reciben terapia endocrina, lo cual se ha observado claramente cómo disminuye el riesgo de recurrencia ipsilateral y en la mama contralateral hasta en un beneficio del 50% a 5 años. La terapia hormonal no solo es más sencilla de administrar a la población, sino que además es mucho más económica que otras terapias, afortunadamente este porcentaje de pacientes que reciben estos tratamientos es alto, ya que está en relación con el perfil molecular del tumor, que cuando se trata de un luminal, el más frecuente de todos los cánceres de mama (hasta en un 70%), se espera un beneficio mayor con este tratamiento.

Sin embargo, también un alto porcentaje (hasta un 40%) muestra resistencia a la terapia endocrina,¹ e incluso el 10% de todas las pacientes que reciben tratamiento hormonal presentarán recaída durante su seguimiento.²⁹ Esto concuerda con lo encontrado en nuestra población de estudio, donde todas las pacientes mostraron positividad para los receptores hormonales, encontrando 4 recurrencias de 40 pacientes (10%) durante el seguimiento de 48 meses, lo que coincide con lo documentado.

Si bien hablamos de un estatus hormonal que es medido en todas las pacientes desde hace más de 30 años, es importante conocer que en la glándula mamaria se encuentran dos tipos diferentes de receptores de estrógenos, los receptores alfa y los beta, que de éste último no se realiza un análisis en las pacientes con cáncer de mama y que su papel no es claro, ni está establecido si su presencia es benéfica o incluso su ausencia sea benéfica en el seguimiento y tratamiento de las pacientes. Este receptor descubierto en 1996, ha sido estudiado por múltiples autores tanto en líneas celulares, como en tejido fresco congelado y bloques de parafina, sin embargo, los resultados no son claros y suele haber discrepancia entre los distintos autores, lo que quizá pudiera explicarse por la existencia de 6 isoformas para el ER β . Por otro lado, en la gran mayoría de las investigaciones únicamente se han

estudiado el ER β 1 y ER β 2, mayormente en líneas celulares muy bien conocidas por sus perfiles hormonales tanto positivos como negativos.

Cowley *et al.* fueron de los primeros en demostrar que la afinidad de los dímeros ER α -ER α y ER α -ER β 1 por los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA es mayor que la afinidad que muestran los dímeros ER β 1-ER β 1, requiriendo en estos casos la unión del ligando para que los complejos receptor-ligando puedan interactuar con los ERE en el DNA.² Sin embargo, ER β 2 puede formar heterodímeros con ER α o ER β 1 sin la necesidad de unirse con su ligando, pudiendo inhibir la unión de ER α y ER β 1 a los ERE. Esto plantea la posibilidad de que ER β 2 actúe como un modulador funcional de ER α y ER β 1.³

Se ha sugerido que existen cambios en la expresión génica de los receptores estrogénicos ER β 1, ER β 2 y ER β 5 durante los inicios del desarrollo del cáncer, con predominio en la expresión de los ER β 2 y ER β 5. Por otro lado, se ha propuesto que la expresión del ER β 1 tiene una relación inversa con el nivel de malignidad del tumor y el grado de inflamación, mientras que el ER β 2 se eleva significativamente con el grado de infiltración de linfocitos en el tejido tumoral.⁴ Por otro lado, Järvinen *et al.* analizaron 92 especímenes de pacientes con cáncer de mama en tejido fresco congelado, de los cuales 55 presentaron positividad para el ER β , y éstos a su vez se relacionaban de forma estadísticamente significativa con ganglios negativos, grado histológico bajo y pacientes en estado premenopáusico, por lo que Järvinen *et al.* concluyeron que los tumores ER β positivos se asocian con características biológicas menos agresivas, que teóricamente responderían mejor a la terapia hormonal y que el ER β podría ser un factor predictivo independiente.¹

Por otro lado, la proporción ER α /ER β también se ha correlacionado con la resistencia a los diferentes tratamientos, no solo hormonales sino citotóxicos. En líneas celulares con una proporción ER α /ER β alta y una sobreexpresión del ER β se ha visto que la acción del cisplatino (CDDP) se ve incrementada tanto en la apoptosis como en la producción de estrés oxidativo, es decir, la sobreexpresión del ER β incrementa la sensibilidad al CDDP por las células.⁹ La inhibición del ER β en la línea celular T47D incrementa la eficacia del tratamiento con tamoxifeno, con

aumento en la producción de estrés oxidativo y apoptosis, en la línea celular MCF-7 la sobreexpresión de ER β mostró una mejor respuesta al tamoxifeno por aumento de la muerte celular y autofagia. Así mismo Razandi *et al.* en el 2013 evidenciaron que la presencia de ER β en la mitocondria podría mejorar la respuesta al tamoxifeno en el cáncer de mama resistente a este tratamiento.¹⁰ Al-Bader *et al.*,¹¹ demostraron que el ER β 1 se expresó en todas las líneas celulares estudiadas, el ER β 2 se expresó en todas las líneas celulares ER positivos y en algunas ER negativos (MDA-MB-231, MDA-MB-453 y SK-BR-3). Las líneas MCF7, ZR-75-1, MDA-MB-453, HCC1954 y T-47D expresaron la variante ER β 5. Esto demuestra que, en estas líneas celulares de cáncer de mama, las cuales son ampliamente utilizadas en investigación y que se conocen como ER negativos, expresan RNA mensajero y proteínas correspondientes a genes de receptores estrogénicos alfa y/o beta. Asimismo, pone en evidencia que nuestro entendimiento sobre la expresión génica de las distintas variantes o isoformas de los receptores estrogénicos a nivel funcional requiere de más investigación.

En el presente trabajo se analizaron 40 especímenes conservados en bloques de parafina de pacientes sometidas a cirugía como tratamiento inicial del cáncer de mama, en etapas tempranas y localmente avanzadas y sin tratamiento neoadyuvante, pudiendo observar que del total de las pacientes un alto porcentaje se mostró positiva para la expresión del ER β 1, ER β 2 y ER β 5 con una expresión relativa de 6.38, 3.37 y 6.20 respectivamente. Las características generales de nuestra población son de buen pronóstico con un tamaño tumoral patológico promedio de 20.85 \pm 9.36 mm, 27 pacientes cursaron con axila negativa, en su mayoría las pacientes se encontraban en etapa IA (16/40) y etapa IIA (17/40), la estirpe en 38 pacientes fue ductal, con gado histológico de 2 en 17/40, todas mostraron más de 1% de expresión de receptores de estrógeno alfa, por lo que el perfil molecular más frecuente fue el luminal con 34/40 la edad promedio fue de 54 años y el índice de masa corporal promedio de 28 kg/m². En general estas características nos sugieren buen pronóstico, sin embargo, el haber encontrado una expresión génica elevada de las isoformas β 1, β 2 y β 5 del ER en un alto porcentaje de las pacientes, sugiere la importancia de realizar una búsqueda intencionada por

inmuhohistoquímica de estas isoformas. Es importante señalar que la mayor expresión génica de la isoforma $\beta 5$ correspondió al perfil molecular de HER-2 sobreexpresado. Finalmente, el presente estudio sienta las bases para futuras investigaciones en las que se evalúe el papel pronóstico y/o predictivo de la presencia de las isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$; y la nula o muy baja expresión de las isoformas $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 6$.

4.3. CONCLUSIONES

No existe estudio que haya analizado la expresión a nivel de RNA mensajero de las 6 isoformas del receptor de estrógenos β , ya sea en tejido fresco congelado, especímenes en bloques de parafina o líneas celulares, tampoco se ha realizado éste análisis completo a través de inmunohistoquímica.

En pacientes con cáncer de mama invasor, unilateral, tratadas de forma inicial con cirugía, las isoformas que mostraron mayor expresión génica en el tejido tumoral fueron $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$ del total de nuestra población. Este hallazgo permitirá realizar la búsqueda intencionada por inmunohistoquímica de estas isoformas mayormente expresadas, y sienta las bases para futuros estudios en los que se evalúe el papel pronóstico y/o predictivo de la presencia de las isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$; y la nula o muy baja expresión de las isoformas $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 6$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Järvinen Tero A. H., Markku Pelto-Huikko, Kaija Holli et al. Estrogen Receptor β Is Coexpressed with ER α and PR and Associated with Nodal Status, Grade, and Proliferation Rate in Breast Cancer. *American Journal of Pathology*. 156. 2000; 29-35.
2. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker SG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*. 1997; 272:19858–19862.
3. Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen receptor (ER) β 1 and ER β cx/ β 2 inhibit ER α function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene*. 2003; 22:5010-5020.
4. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor b1, b2, and b5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res*. 1999; 59:1175–1179.
5. Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Gustafsson JA, Iwase H. Evaluation of oestrogen receptor β wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2002; 38:380-386.
6. Huang B, Omoto Y, Iwase H, Yamashita H, Toyama T, Coombes RC, Filipovic A, Warner M, Gustafsson JÅ. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:1933-1938.
7. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*. 2001; 61:2537–2541.
8. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, Matsuura M, Ito Y, Akiyama F, Sakamoto G. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26:3727–3734.
9. Pons Daniel Gabriel, Torrens-Mas Margalida, Nadal-Serrano Mercedes et al. The presence of Estrogen Receptor β modulates the response of breast cancer

- cells to therapeutics agents. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 66. 2015; 85-94.
10. Razandi, M., Pedram, A., Jordan, V.C., Fuqua, S., Levin, E.R.,. Tamoxifen regulates cell fate through mitochondrial estrogen receptor beta in breast cancer. *Oncogene* 2013; 32, 3274–3285.
 11. Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med.* 2011; 2(3):537-544.
 12. Globocan 2012 (homepage on the internet). Lyon, France: Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence in 2012. International Agency for Research on Cancer. http://www.globocn.iarc.fr/pages/fact_sheet_cancer.asp
 13. Reynoso-Noveron N, Villareal-Garza C, Soto-Perez-de-Celis E, Arce-Salinas C, Matus-Santos J, Ramírez-Ugalde MT, Alvarado-Miranda A, Cabrera-Galeana P, Meneses-García A, Lara-Medina F, Bargalló-Rocha E, Mohar A. Clinical and epidemiological profile of breast cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *J Glob Oncol.* 2017; <http://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JGO.2016.007377>.
 14. Cardenas-Sánchez J, Bargalló-Rocha E, Erazo-Valle A, Poitevin Chacón A, Valero Castillo V, Pérez Sánchez V. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. *GAMO.* 2015; 14(Supl 2):2-55.
 15. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer [Not authors listed]. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 1996; 347:1713-727.
 16. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, Fraser G, Goldbohm RA, Graham S, Kushi L, Marshall JR, Miller AB, Rohan T, Smith-Warner SA, Speizer FE, Willet WC, Wolk A, Hunter DJ. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol.* 2000; 152:514-526.

17. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel Members. A.S. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015; 26:1533-1546.
18. Cancer AJCo: AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer, 2010.
19. National Comprehensive Cancer Network. Breast Cancer. 2.2017.
20. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 2014; 5:412-424.
21. Hayes DF, Trock B. Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is «statistically significant» clinically useful? *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 52:305-319.
22. Lyndsay Harris, Herbert Fritsche, Robert Menzel, Larry Norton, Peter Ravdin, Sheila Taube, Mark R. Somerfield, Daniel F. Hayes, and Robert C. Bast Jr. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287-5312.
23. Misawa A, Inoue S. Estrogen-related receptors in breast cancer and prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015; 6:83.
24. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82:7889–7893.
25. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:5925–5930.
26. Locker GY: Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 1998, 24:221–240
27. Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PT. Human oestrogen receptors: differential expression of ERalpha and beta and the identification of ERbeta variants. *Steroids.* 2002; 67:985-992.

28. Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Kobayashi S, Iwase H. Clinical value of the wild-type estrogen receptor β expression in breast cancer. *Cancer Lett.* 2001; 163:207-212.
29. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R. Expression of estrogen receptor β messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res.* 1998; 58:210-214.
30. Mosselman S, Polman J, Dijkma R. ER- β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996; 392:49-53.
31. Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:1569–1580.
32. Superti-Furga G, Bergers G, Picard D, Busslinger M. Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:5114–5118.
33. Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:3739–3746.
34. Palmieri C, Saji S, Sakaguchi H, Cheng G, Sunter A, O'Hare MJ, Warner M, Gustafsson JA, Coombes RC, Lam EW. The expression of oestrogen receptor (ER)-beta and its variants, but not ERalpha, in adult human mammary fibroblasts. *J Mol Endocrinol.* 2004; 33:35–50.
35. Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J Clin Pathol.* 2002; 55:371–374.
36. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000; 65:227–251.
37. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997; 138:863-870.

38. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell-and promoter- specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 1997; 410:87-90.
39. Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 1997; 272:25832-25838.
40. Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor- α or estrogen receptor- β . *Endocrinology.* 1999; 140:800–804.
41. Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: A dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 51:55–67.
42. Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci.* 2015; 106:337-343.
43. Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor –beta in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:2371-2374.
44. Serri Mann, Laucirica Rodolfo, Carlson Nicole et al, Estrogen Receptor Beta Expression in Invasive Breast Cancer. *Human Pathology.* 32. 2001; 113-118.
45. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterisation of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247:75–78.
46. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta α : a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:3505–3512.
47. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK and Lupu R. Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res.* 1998; 58:210–214.

48. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers. *Int. J. Cancer*, 2000; 88:733–736.
49. Tong D, Schuster E, Seifert M, Czerwenka K, Leodolter S, Zellinger R. Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 71:249–255.
50. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289:692–699.
51. Mäkinen S, Mäkela S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson JA. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:497–503.
52. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor β forms estrogen receptor response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:1486–1496.

ANEXOS

ANEXO A

Secuencias Obtenidas en el GenBank para las isoformas del ER β 2

>NM_001437.2 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant a, mRNA

```
CTCGGTCTTTAAAAGGAAGAAGGGGCTTATCGTTAAGTCGCTTGTGATCTTTTCAGTTTCTCCAGCTGCT
GGCTTTTTTGGACACCCACTCCCCCGCCAGGAGGCAGTTGCAAGCGCGGAGGCTGCGAGAAATAACTGCCT
CTTGAAACTTGCAGGGCGAAGAGCAGGCGGGCGAGCGCTGGGCCGGGGAGGGACCACCCGAGCTGCGACGG
GCTCTGGGGCTGCGGGGCAGGGCTGGCGCCCGGAGCCTGAGCTGCAGGAGGTGCGCTCGCTTTTCTCAAC
AGGTGGCGGGCGGGGCGCGCCGGGAGACCCCCCTAATGCGGGAAAAGCACGTGTCCGCATTTTAGAGA
AGGCAAGGCCGGTGTGTTTATCTGCAAGCCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGAC
CTTTGTGCCTCTTCTTGAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCAT
CTAGCCTTAATTCTCCTTCTCCTTACAACACTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATA
CATACTTCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATG
AATTACAGCATTCCCAGCAATGTCACTAACTTGAAGGTGGGCCTGGTTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG
TGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA
ACCTCAAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACTG
AAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGGATGCTCACT
TCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGC
CTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT
AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTG
GCTCCCGGAGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTG
TGCCGGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGCCACGCGCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGC
CCCGAGCAGTAGTGTCTACCCCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGC
CCTTACCCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG
CTGGGCCAAGAAGATTCCCGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTGCGGCTCTTGGAGAGCTGT
TGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTC
CAGATCTTGTCTGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCT
GGCACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACACAAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATC
CTGCTCAATTCCAGTATGTACCCTCTGGTACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC
ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCA
ATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCTCCTGTCCCACGTGAGGCATGCGAGTAACAAGGGCATGGAA
CATCTGCTCAACATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCAGTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCC
ACGTGCTTTCGCGGGTGCAAGTCCATCACGGGGTCCGAGTGCAGCCCGGCAGAGGACAGTAAAAGCAA
AGAGGGCTCCCAGAACCACAGTCTCAGTGACGCCTGGCCCTGAGGTGAACTGGCCACAGAGGTACACAG
GCTGAAGCGTGAACCTCAGTGTGTGAGGAGCCTGGGCTTCATCTTTCTGCTGTGTGGTCCCTCATTTGG
```

>NM_001040275.1 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant b, mRNA

```
CTCGGTCTTTAAAAGGAAGAAGGGGCTTATCGTTAAGTCGCTTGTGATCTTTTCAGTTTCTCCAGCTGCT
GGCTTTTTTGGACACCCACTCCCCCGCCAGGAGGCAGTTGCAAGCGCGGAGGCTGCGAGAAATAACTGCCT
CTTGAAACTTGCAGGGCGAAGAGCAGGCGGGCGAGCGCTGGGCCGGGGAGGGACCACCCGAGCTGCGACGG
GCTCTGGGGCTGCGGGGCAGGGCTGGCGCCCGGAGCCTGAGCTGCAGGAGGTGCGCTCGCTTTTCTCAAC
AGGTGGCGGGCGGGGCGCGCCGGGAGACCCCCCTAATGCGGGAAAAGCACGTGTCCGCATTTTAGAGA
AGGCAAGGCCGGTGTGTTTATCTGCAAGCCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGAC
CTTTGTGCCTCTTCTTGAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCAT
CTAGCCTTAATTCTCCTTCTCCTTACAACACTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATA
CATACTTCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATG
AATTACAGCATTCCCAGCAATGTCACTAACTTGAAGGTGGGCCTGGTTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG
TGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA
ACCTCAAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACTG
AAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGGATGCTCACT
TCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGC
CTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT
```

AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTG
GCTCCCGGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTG
TGCCGGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGC
CCCGAGCAGCTAGTGCTCACCCCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGC
CCTTCACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG
CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTGC GGCTCTTGGAGAGCTGT
TGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTC
CAGATCTTGTCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCT
GGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACACAAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATC
CTGTCAATTCAGTATGTACCCTCTGGTACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC
ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCA
ATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCTCCTGTCCCACGTGAGGCATGCGAGGGCAGAAAAGGCCTCT
CAAACACTCACCTCATTTGGAATGAAGATGGAGACTCTTTTGCCTGAAGCAACGATGGAGCAGTGACCCT
CTAATCAACTCGGTGGCCTAAAGAAAAATCTTGGGTAACATTTTCACTTCAGTTTCCCTCTGGGATCATT
GTAATCCATGAAAAAATAATTTTAAAGAAAGAGTTAAAATACTTTGAAGTTAGTTATGTGGTTAAAAAC
CACCTTCCTTTCTATTATCAATCCAACAATTTGATAACTGTAAACGCTAAAGTGAAGACGGATTCTCTTC
AGATGGTCTCCTTAACTGCCCAGGGCTTGCAGATGTCTCACCCATGAGGGGCACCAATGTAGAAAGCTGA
GGCTTCATCTACTGATGAGCTTCACTGGTTTTCCCTGAGGTTTTGTGCTTTGGCAGAGAAGGGGAGGAGGG
GACTGGGATTGTGTGGTCAGCTGTGCCTGCCAACAGATGCAGGTTAGGAAGTGTGTTTCAGTATCTTCCAA
TAAGAAAGGGGAAATGCCGATGCCTATCCTCTTTGTTTAGGTAGAAAGTAAAATGCTACTGGACTTAAAT
GGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>NM_001214902.1 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant d, mRNA

CCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTCAAGGTGTTTT
CTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTTCTCCTTCCCTCCTACAA
CTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCCCTCCTATGTAGACAGCCAC
CATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAATGTCACTA
ACTTGAAGGTGGGCCTGGTCCGCAGACCACAAGCCAAATGTGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTC
TCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGAACCTCAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCA
AGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCG
CCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCATTACGCATC
GGGATCTCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACAT
AATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCT
GCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAGAGAGAGATGTGGGTACCG
CCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGC
CACGCGCCCCGAGTGC GGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCCCTCCTGG
AGGCTGAGCCGCCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGC GCCCTTCAACGAGGCCTCCATGATGATGTC
CCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTG
GAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTGC GGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGA
TGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGTCTGGACAGGGATGAGGG
GAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTA
AAACTCCAACACAAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTACCCTCTGG
TCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGTGTAACGCCGTGACCGATGCTTT
GGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATG
CTCCTGTCCCACGTGAGGCATGCGAGATGGGGAGAAAAGCAATTCATTCATTTGAAGTTATCTTAGTGCC
AAGAGTCATGTGAAAATGTCCCTTGCATGTGGGCAATGAAAGATTTGCAGACGATATAAAAACCCAGACTA
CCTCATAAAAGAGTTTTGGGAATACACTGAGCTTTGAGTGAAGAAGCTGCAGTGGCCTCCCTGGAGATG
GGGAGCAAACAGCTTAAAGGCCCTTATCCTGAGGAAGAGACAAAAATTGACATGCACAATATTAAGCTT
TGAAATGCAGACACACTTCCCTTTCAGTCAACTTTGACTTGTCCCGCATCTACTTCAAGGGCAGAAAA
GGCCTCTCAAACACTCACCTCATTGGAATGAAGATGGAGACTCTTTTGCCTGAAGCAACGATGGAGCAG
TGACCCTCTAATCAACTCGGTGGCCTAAAGAAAAATCTTGGGTAACATTTTCACTTCAGTTTCCCTCTGG
GATCATTGTAATCCATGAAAAAATAATTTTAAAGAAAGAGTTAAAATACTTTGAAGTTAGTTATGTGGT
TAAAAACCACCTTCCCTTTCTATTATCAATCCAACAATTTGATAACTGTAAACGCTAAAGTGAAGACGGAT
TCTCTTCAGATGGTCTCCTTAACTGCCCAGGGCTTGCAGATGTCTCACCCATGAGGGGCACCAATGTAGA
AAGCTGAGGCTTCATCTACTGATGAGCTTCACTGGTTTTCCCTGAGGTTTTGTGCTTTGGCAGAGAAGGGG

AGGAGGGGACTGGGATTGTGTGGTCAGCTGTGCCTGCCAACAGATGCAGGTTAGGAACTGTGTTTCAGTAT
CTTCCAATAAGAAAGGGGAAATGCCGATGCCTATCCTCTTTGTTTGGTTAGGTAGAAAGTAAAATGCTACTGGA
CTTAAATGGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**>NM_001271876.1 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant f,
mRNA**

CCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTT
CTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTCTCCTTCCTCCTACAA
CTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCTCCTATGTAGACAGCCAC
CATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAATGTCACTA
ACTTGGAAGGTGGGCTGGTCGGCAGACCACAAGCCAAATGTGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTC
TCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGAACCTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCA
AGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCG
CCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATC
GGGATATCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACAT
AATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCT
GCCGACTTCGGAAGTGTTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAGAGAGAGATGTGGGTACCG
CCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGC
CACGCGCCCCGAGTGC GGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGTCAACCTCCTGG
AGGCTGAGCCGCCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGC GCCCTTACCCGAGGCCTCCATGATGATGTC
CCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTG
GAGCTCAGCCTGTTGACCAAGTGC GGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGA
TGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGTCTGGACAGGGATGAGGG
GAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTA
AAACTCCAACACAAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTACCCTCTGG
TCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGTGTAACGCCGTGACCGATGCTTT
GGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATG
CTCCTGTCCCACGTGAGGCATGCGAGGTCCTGTGTATAACAAGTAAAATGCAGCTCACAAAAGTCCTGGTA
TCCAGTGCATCGATTATTTGGATAGATTTTCTGTAATCATTCTGAGTTTGATTAGAATTATATCCTTTAC
AGATGGGGAGAAAAGCAATTCATTCATTTGAAGTTATCTTAGTGCCAAGAGTCATGTGAAAATGTCCCTT
GCATGTGGGCAATGAAAGATTTGCAGACGATATAAAAACCCAGAC

**>NM_001271877.1 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant g,
mRNA**

CCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTT
CTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTCTCCTTCCTCCTACAA
CTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCTCCTATGTAGACAGCCAC
CATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAATGTCACTA
ACTTGGAAGGTGGGCTGGTCGGCAGACCACAAGCCAAATGTGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTC
TCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGAACCTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCA
AGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCG
CCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATC
GGGATATCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACAT
AATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCT
GCCGACTTCGGAAGTGTTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAGAGAGAGATGTGGGTACCG
CCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGC
CACGCGCCCCGAGTGC GGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGTCAACCTCCTGG
AGGCTGAGCCGCCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGC GCCCTTACCCGAGGCCTCCATGATGATGTC
CCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGTATGTAC
CCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGTGTAACGCCGTGACCG
ATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCT
CCTGATGCTCCTGTCCCACGTGAGGCATGCGAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCTCAACATGAAGTGC
AAAAATGTGGTCCCAGTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCCACCGTCTTCGCGGGTGAAGT
CCTCCATCACGGGTCCGAGTGCAGCCCCGAGAGGACAGTAAAAGCAAAGAGGGCTCCCAGAACCCACA

GTCTCAGTGACGCCTGGCCCTGAGGTGAACTGGCCCCACAGAGGTCACAGGCTGAAGCGTGAAGCTCCAGTG
TGTCAGGAGCCTGGGCTTCATCTTTCTGCTGTGTGGTCCCTCATTTGG

>NM_001291723.1 Homo sapiens estrogen receptor 2 (ESR2), transcript variant I,
mRNA

GTGTGAGGGCGCCCGGCTTCCAGGCAGTAATGGGCGGGTCCCTGCGCGGGAGCGTGGCGGGCGCTGGACT
CTACAGCAGATGTGGAAGTGGAGAGCTTGGCGCGCCTTCCGACTTTGTACACACCTGCGCCGCCAGACT
GGGGTGGGGCCCCCTCCGCGTTCTGCTCTGGAGTGCCTGGGTCTGGGCCAGCACCAGCGCTTTTAGAATCT
CCTCAGCTGAATCTGACGCTCAGCAGTGGGTGAAGCGCAGCCCCCTGTTTCAGGCCCTGCCGAGCTGGAA
GGAGTGTGAGAGCTGGAGCGCGCGTGGCCCCCTCTGTGTTGGGGTACCCCCGGGGTTGCCAGGGCTCAGG
GAGGGTTCGTAGTCTGGATTTTGTACCCGACAGTCCCCACCCCCAGCAGGTCTGGGGTTGGAGAATCCA
CGCGGGCTTCATAAGCTAGATGCCAGTTAACTGTGAGAGGGGACGCTCCCTCCTCGTAGGCGTCCACAC
TGGAGAAGGAATAAGATGGGCGATTGCCTGGGAAGCCTGACAGGGCGGCGGCAGCTGGGATGCTGGAGAG
GACTGGCCCCCTTGAGTTACTGAGTCCGATGAATGTGCTTGGCTCTGCTGGAGGAACCGCGCTCAGGTTACA
GTCATCCCCAATATGGTTCTGAAGCCATTATACTTGGCCACGAATCTTTGAGAACATTATAATGACCTTTG
TGCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAAACTCACCATCTAGC
CTTAATTCTCCTTCCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCTGGAGCACGGCTCCATATAACATA
CTTCCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTA
CAGCATTCCCAGCAATGTCACTAACTTGAAGGTGGGCTGGTTCGGCAGACCACAAGCCCCAATGTGTTG
TGGCCAACACCTGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGAACCTC
AAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAG
GAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGC
GCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTATGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTT
TTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAA
CCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCC
CGGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCG
GCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGACGCCCTGAGCCCCGA
GCAGCTAGTGTCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTC
ACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGG
CCAAGAAGATTTCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTCGACCAAGTGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGAT
GGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGAT
CTTGTCTGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCTGGCAA
CTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACTCCAACACAAAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCT
CAATTCCAGTATGTACCCTCTGGTCAACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTG
CTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCA
TGGCCTGGCTAACCTCCTGATGCTCCTGTCCACGTGAGGATGCGAGGGCAGAAAAGGCCTCTCAAAC
ACTCACCTCATTTGGAATGAAGATGGAGACTCTTTTGCCTGAAGCAACGATGGAGCAGTGACCCTCTAAT
CAACTCGGTGGCCTAAAGAAAAATCTTGGGTAACATTTTCACTTCAGTTTCCCTCTGGGATCATTGTAAT
CCATGAAAAAATAATTTTAAAGAAAGAGTTAAAATACTTTGAAGTTAGTTATGTGGTTAAAAACCACCT
TCCTTTCTATTATCAATCCAACAATTTGATAACTGTAAACGCTAAAAGTGAAGACGGATTCTCTTCAGATG
GTCTCCTTAACTGCCCAGGGCTTGAGATGTCTCACCCATGAGGGGCACCAATGTAGAAAGCTGAGGCTT
CATCTACTGATGAGCTTCACTGGTTTTCCCTGAGGTTTTGTGCTTTGGCAGAGAAGGGGAGGGGGACTG
GGATTGTGTGGTCAGCTGTGCCTGCCAACAGATGCAGGTTAGGAACTGTGTTCAAGTATCTTCCAATAAGA
AAGGGGAAATGCCGATGCCTATCCTCTTTGTTTAGGTAGAAAGTAAAATGCTACTGGACTTAAATGGGCA
AAAAAAAAAAAAAAAA

ANEXO B

Autorización por el Comité de Ética en Investigación del INCan.



Instituto Nacional de Cancerología



"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

No. Ref. INCAN/CI/478/17

CDMX, a 04 de Mayo del 2017

Dr. David F. Cantú de León
Dra. Jessica Salazar Campos
Investigadores Principales
Presente.

En relación a su solicitud del proyecto titulado: "Expresión Génica de las Isoformas del receptor de estrógeno tipo Beta en pacientes con cáncer de mama tratadas inicialmente con cirugía", (Rev/19/17), se autoriza la realización del mismo, debido a que es un estudio sin riesgo, ya que utilizaran material archivado en patología y expedientes clínicos, por lo tanto, NO es necesaria la aprobación de un Consentimiento Informado.

Reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Luis A. Herrera Montalvo
Presidente del Comité de Investigación

SAB/ver