



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**Asociación de la expresión del gen *BIK/NBK* con la expresión de receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas.**

**TESIS**

Como un requisito para obtener el diploma de

**Especialista en Genética Médica**

**P R E S E N T A**

**Adelina Hernández Zarco**

Tutor: M en C. Eunice López Muñoz

Cotutor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Colaboradores: Dr. Fabio Salamanca Gómez  
Dr. Gelazio Zarco Espinosa  
Dr. Mauricio Enrique Gómez del Toro  
Dra. Isabel Alvarado Cabrero  
Dra. Ivone Cuadra García  
HT. Oscar Martínez Quirarte

Dirección del tutor y de la aspirante: Laboratorio de Genética Molecular, UIM  
Genética Humana, CMN SXXI, IMSS. Teléfono 56 27 69 41, 56 27 69 45,  
Fax 55 88 51 74. Correo Electrónico: adelinahz@hotmail.com

México, Distrito Federal. Agosto 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

A mis Padres por brindarme su amor, consejos, ejemplo y su vida.

A mis hermanos por su amor, apoyo y compañía.

A quienes ya no están con nosotros pero continúan en nuestros pensamientos.

A las pacientes con cáncer de mama que día a día se debaten entre la vida y la muerte y a sus familias quienes mantienen la esperanza en los avances de la ciencia.

Antsive'entsa

## **AGRADECIMIENTOS**

A lo que muchos nombran de diferentes formas, algunos lo llaman ciencia, otros naturaleza, otros destino... y otros Dios.

A Eunice López Muñoz por su enseñanza, paciencia, dedicación y entrega.

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez por su confianza puesta en nosotros, por servirnos de ejemplo y guía durante nuestra formación.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda por su enseñanza, palabras de estímulo y apoyo durante todo este tiempo.

A la Dra María Antonieta Araujo Solis y al Dr Juan Carlos Huicochea Montiel por la dedicación nos brindaban a nosotros y a los pacientes cada día.

A los colaboradores adscritos al Hospital de Oncología que a pesar de las adversidades han logrado mantener una actitud de servicio en pro de los pacientes Dr. Gelazio Zarco Espinosa, Dr. Mauricio Enrique Gómez del Toro, Dra. Isabel Alvarado Cabrero, Dra. Ivone Cuadra García e HT. Oscar Martínez Quirarte, a todos ellos gracias por su enseñanza.

A mis Compañeros residentes por su compañía y apoyo.

A la Psic. Gabriela Galicia por su ayuda durante este tiempo y por tratar de mejorar la salud integral de nuestros pacientes.

Al Dr. Roberto Guevara Yáñez por su enseñanza incondicional.

A los sinodales por sus consejos para mejorar este trabajo, Dr. Fabio Salamanca Gómez, Dra Ana Carolina Sepúlveda Vildósola, Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa,.Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel y Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré.

Al Dr. Mario Enrique Rendón Macías y al Dr. Miguel Angel Villasis Kever por sus enseñanzas para realizar este trabajo.

A quienes en su momento me han ayudado a mejorar como médico y como persona.

**Lugar de realización del proyecto:**

Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, CMN S-XXI, IMSS en colaboración con los servicios de Tumores de Mama y Anatomía Patológica del Hospital de Oncología, CMN S-XXI, IMSS.

**El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación:**

“Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama” el cual fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica con número de registro 2007-785-063 (Anexo 1). Dicho proyecto también fue autorizado para recibir financiamiento por el Fondo de Investigación en Salud, IMSS (Anexo 2).

## ÍNDICE

	Pag.
<b><u>RESUMEN</u></b>	11
<b><u>ANTECEDENTES</u></b>	13
<b>GENERALIDADES</b>	13
<b><u>ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER DE MAMA</u></b>	13
<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	13
Factores de riesgo	14
<b>DETECCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA</b>	15
Autoexploración	15
Mamografía	15
<b>CUADRO CLÍNICO</b>	16
<b>DIAGNÓSTICO</b>	17
<u>Biopsia</u>	17
Ultrasonido	17
<u>Mamografía</u>	17
<u>Otras modalidades de imagen</u>	17
<u>Citología</u>	18
<b>DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL</b>	18
<b>ESTADIFICACIÓN</b>	18
<b>TIPOS PATOLÓGICOS</b>	18
<b>RECEPTORES HORMONALES</b>	20
<b>RECEPTOR HER-2/<i>neu</i></b>	21
<b>TRATAMIENTO</b>	22
Elección de la terapia primaria	22
Terapia conservadora	22
<b>PRONÓSTICO</b>	23
<b><u>ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA</u></b>	24
<b>ESTRÓGENOS</b>	24

Vía No Genómica	25
Vía Genómica	25
RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER)	26
CICLO CELULAR	27
APOPTOSIS	28
PROTEÍNAS BCL-2	29
<i>BIK</i>	29
RELACIÓN ENTRE <i>BIK</i> Y ESTRÓGENOS	31
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	32
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	32
<u>OBJETIVO</u>	32
<u>HIPÓTESIS</u>	33
<u>DISEÑO DEL ESTUDIO</u>	33
<u>LUGAR DEL ESTUDIO</u>	33
<u>POBLACIÓN DE ESTUDIO</u>	33
<u>CRITERIOS DE SELECCIÓN</u>	33
Criterios de Inclusión	33
Criterios de Exclusión	33
Criterios de Eliminación	33
<u>CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA</u>	34
<u>MUESTREO</u>	34
<u>VARIABLES DEL ESTUDIO</u>	35
<u>ASPECTOS ÉTICOS</u>	35
<u>RESULTADOS</u>	36
Muestras de tejido mamario neoplásico	38
Extracción de RNA	39
Transcripción Reversa	40
qPCR	41
Expresión de Receptores de Estrógenos	45
<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	48
<u>DISCUSIÓN</u>	49



<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>52</b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1.</b>	
<b>APROBACIÓN DE LA COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA CON NÚMERO DE REGISTRO 2007-785-063.</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 2.</b>	
<b>APROBACIÓN DE FINANCIAMIENTO POR EL FONDO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, IMSS.</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 3. ESTADIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 4. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.</b>	<b>60</b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>61</b>
<b><u>RECURSOS HUMANOS Y FINANCIEROS</u></b>	<b>69</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b> Factores asociados con el incremento del riesgo de cáncer de mama.	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Tipos histológicos en cáncer de mama.	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b> Sobrevida (%) de pacientes con cáncer de mama por estadificación TNM.	<b>24</b>
<b>Tabla 4.</b> Variables del Estudio.	<b>35</b>
<b>Figura 1.</b> Porcentaje del tipo histológico en 13 biopsias de pacientes con alta sospecha de cáncer de mama.	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Porcentaje del tipo histológico encontrado en 11 biopsias de pacientes con alta diagnóstico de cáncer de mama.	<b>37</b>
<b>Figura 3.</b> Distribución por edad de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama.	<b>37</b>
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de receptores de estrógenos negativos y positivos encontrados en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama.	<b>38</b>
<b>Tabla 5.</b> Preparación de Master Mix en tubo separado.	<b>41</b>
<b>Tabla 6.</b> Preparación de Master Mix de todos los componentes excepto el cDNA.	<b>42</b>
<b>Figura 5.</b> qPCR para el gen <i>HPRT</i> con LUX primers (Invitrogen).	<b>43</b>
<b>Figura 6.</b>	

qPCR para el gen <i>BIK</i> con LUX primers (Invitrogen).	44
<b>Tabla 7.</b> Componentes de la solución amortiguadora PBS 10X pH 7.2.	45
<b>Tabla 8.</b> Componentes de la solución de SCOTT.	45
<b>Tabla 9.</b> Componentes de la solución de GILLS.	45
<b>Figura 7.</b> Fotografía de carcinoma ductal infiltrante analizada mediante estudio inmunohistoquímico en el que se muestra la positividad a receptores de estrógenos.	47
<b>Tabla 10.</b> Correlación no paramétrica.	48
<b>Tabla 11.</b> Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN de acuerdo al tumor.	55
<b>Tabla 12.</b> Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN de acuerdo la evaluación de ganglios linfáticos regionales.	56
<b>Tabla 13.</b> Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN, evaluación por estudio histopatológico y por biología molecular.	56
<b>Tabla 14.</b> Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN, clasificación de acuerdo a la presencia de metástasis.	58
<b>Tabla 15.</b> Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN.	58

## **“Asociación de la expresión del gen BIK/NBK con la expresión de receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas”.**

Tesista: Hernández Zarco Adelina, Residente de Genética Médica, HP, CMN SXXI, IMSS.

Tutor: M en C. Eunice López Muñoz UIM Genética Humana, HP, CMN SXXI, IMSS.

Cotutor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda UIM Genética Humana, HP, CMN SXXI, IMSS.

### **RESUMEN:**

*Introducción:* El cáncer de mama es un problema de salud a nivel nacional e internacional considerándose una entidad heterogénea en su presentación clínica, genética y bioquímica. Una de las vías celulares involucradas en el desarrollo del cáncer es la apoptosis y entre los mecanismos reguladores de ésta se encuentra la familia de genes BCL-2. El gen *BIK* pertenece a esta familia y se ha reportado sobreexpresado en líneas celulares tumorales mamarias cuando hay privación estrogénica o exposición a agentes anti-estrogénicos en estudios *in vitro*, sin embargo hasta el momento no había resultados concluyentes de lo que sucedía en humanos.

*Objetivo:* Correlacionar la expresión de *BIK* con la expresión del receptor de estrógenos a en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con Cáncer de mama.

*Pacientes y Método:* Se determinó la expresión del gen *BIK* mediante RT-qPCR y la expresión de receptores de estrógeno mediante inmunohistoquímica de 11 muestras de tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama en diferentes estadios clínicos analizándose mediante la correlación de Spearman.

*Resultados:* Se encontró una correlación inversa estadísticamente significativa entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos a en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas.

*Conclusiones:* Considerando la correlación inversa entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos a resulta evidente la necesidad de plantear nuevos estudios con el fin de determinar los mecanismos por los cuales se encuentran relacionados y las variables que modifican el efecto, con el propósito de evaluar la posibilidad de acortar el inicio del tratamiento

antiestrogénico al poderse determinar la presencia del gen *BIK* en el mismo tejido de biopsia realizada con fines diagnósticos y con ello por tanto, mejorar el pronóstico. Así mismo al conocerse más mecanismos moleculares del cáncer se podría evaluar la posibilidad de considerar al gen *BIK* como un posible blanco terapéutico por su función proapoptótica conocida.

**Palabras clave:** Cáncer de mama, gen *BIK*, receptor de estrógenos.

## **ANTECEDENTES**

### **GENERALIDADES**

El cáncer mamario constituye un problema de salud pública a nivel mundial (1). Es heterogéneo en su presentación clínica, genética y bioquímica. Aproximadamente el 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer mamario se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad (2,3).

Se han identificado numerosos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario (4). La historia familiar sugiere un componente hereditario en el desarrollo de algunos cánceres de mama y ha sido considerada como uno de los mayores factores de riesgo conocidos. Se estima que 15 a 20% de mujeres con cáncer mamario tienen una historia familiar de la enfermedad (5-10).

La mayor parte de cáncer mamario, sin embargo corresponde a cáncer esporádico en donde se ha demostrado alteración en factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de señalización intracelular, moléculas de adhesión celular, reguladores de ciclo celular y proteasas (11-13).

## **ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER DE MAMA**

### **EPIDEMIOLOGÍA**

En México el cáncer de mama ocupa el segundo lugar como causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años de edad y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres. Esta neoplasia ha presentado en nuestro país una tendencia al aumento en la mortalidad ya que en 1991 se reportó una tasa de mortalidad por cáncer de mama de 10.6 por 100,000 habitantes en derechohabientes del IMSS y para el año 2001 la tasa de mortalidad se elevó a 11 por 100, 000 habitantes(1-3).

Se considera que para el año 2010 habrá una tasa de mortalidad de 13 por 100,000 mujeres adultas y cerca de 4500 defunciones por año por esta causa en nuestro país (1).

A nivel mundial, la American Cancer Society predice que una de cada ocho mujeres padecerá cáncer mamario durante su vida (14).

## Factores de riesgo

Se han realizado múltiples estudios para identificar factores de riesgo potencialmente modificables en el estilo de vida y factores ambientales relacionados con la presencia de cáncer mamario (Tabla 1) (15), sin embargo el factor de riesgo más significativo identificado es la historia familiar de cáncer mamario. Se ha reportado que el riesgo de cáncer mamario se incrementa en aquellas mujeres cuyas madres o hermanas tuvieron cáncer antes de la menopausia o fue bilateral, y en aquellas con antecedentes familiares de cáncer mamario en dos o más parientes en primer grado. Sin embargo el cáncer de mama familiar ocurre solo en el 10% del total de cáncer de mama y el 90% se considera esporádico (16,17).

**Tabla 1.** Factores asociados con el incremento del riesgo de cáncer de mama.

Edad	Mayor de 40 años de edad
Grupo poblacional	Caucásico
Antecedentes familiares	Cáncer en familiares de primer grado, especialmente premenopáusico o bilateral
Genética	Mutación en BRCA1, BRCA 2, ATM, TP53
Antecedentes personales patológicos	Enfermedad fibroquística Proliferativa Papilomatosis Hiperplasia epitelial atípica Cáncer endometrial Cáncer en la otra mama
Historia menstrual	Menarca temprana (< de 12 años) Menopausia tardía (> de 50 años)
Embarazo	Nuliparidad Primer embarazo después de los 35 años de edad
Hormonales	Uso de estrógenos en la postmenopausia
Alimentarios	Ingesta excesiva de grasas, alcohol

Modificado de Lawrence M. **Current medical diagnosis and treatment. Lange.** USA. 2004.pp 680-681.

## **DETECCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA**

Se han realizado varios programas de detección consistentes en exámenes físicos y mamográficos de mujeres asintomáticas logrando identificar aproximadamente 10 cánceres por 1000 mujeres mayores de 50 años y cerca de 2 cánceres por 1000 mujeres menores de 50 años de edad, el 80% de estas mujeres tiene ganglios linfáticos axilares negativos al momento de la cirugía, mientras que en la práctica médica ordinaria solo 45% tiene ganglios axilares no afectados. La detección del cáncer mamario antes de que se haya propagado hacia los ganglios axilares aumenta notablemente la probabilidad de supervivencia y cerca del 85% de esas mujeres sobrevivirá cuando menos 5 años (13, 14, 18).

Tanto el examen físico como la mamografía resultan necesarios para lograr resultados máximos en los programas de detección, ya que solo 35-50% de los cánceres mamarios tempranos pueden descubrirse sólo mediante mamografía y otro 40% puede detectarse únicamente por palpación. Cerca de la tercera parte de las anomalías descubiertas en las mamografías de detección se encuentran malignas al efectuar la biopsia (18).

### **Autoexploración**

Es una técnica útil de detección temprana de masas tumorales mamarias en donde todas las mujeres mayores de 20 años de edad deben examinar sus glándulas mamarias mensualmente a fin de detectar asimetría de las mamas, masas o alteraciones de la piel. En caso de detectar alteraciones deben acudir inmediatamente al médico para un examen físico (14).

### **Mamografía**

Es la técnica más útil para la detección oportuna de cáncer de mama, llegando a detectarlo incluso antes de que la masa tumoral sea palpable. Los cánceres de crecimiento lento pueden ser detectados por mamografía al menos dos años antes de que el tamaño de éste sea suficientemente grande para ser detectable por palpación (14).



Las calcificaciones son las alteraciones más frecuentemente reconocidas en los estudios mamográficos y de éstas las más asociadas con carcinoma son las microcalcificaciones polimórficas agrupadas.

Dentro de las indicaciones de la realización de mamografía se encuentran:

Detección en mujeres candidatas a cirugía plástica o previa a la biopsia de una masa palpable.

Evaluación de una masa palpable o cambios sospechosos en la glándula mamaria.

Detección a intervalos regulares en mujeres con alto riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Investigación de un cáncer de mama oculto en mujeres con enfermedad metastásica en nódulos axilares o de origen primario desconocido.

Evaluación anual de glándula mamaria con diagnóstico de cáncer de mama que es potencialmente curable.

Seguimiento de mujeres con cáncer de mama quienes han sido tratadas con cirugía conservadora y radiación.

La mamografía debe ser realizada previa a la obtención de una biopsia a fin de encontrar otras áreas afectadas y examinar la mama contralateral. La mamografía nunca es sustituto de biopsia ya que no revela datos de cáncer en glándulas mamarias densas como en el caso de mujeres jóvenes con cambios fibroquísticos y no puede detectar algunos cánceres medulares (19).

### **CUADRO CLINICO.**

El 70% de los pacientes presenta una masa de tamaño y forma indefinida y cerca del 90% de los cánceres mamarios son detectados por el propio paciente. Con menos frecuencia se presentan síntomas como dolor; secreción, erosión, retracción, agrandamiento e irritación del pezón, inflamación, endurecimiento e incremento del tamaño de la mama.

Raramente la presencia de ganglios axilares palpables o edema del brazo son el síntoma inicial. Dolor de espalda o dolor óseo, ictericia o pérdida de peso pueden ser el resultado de metástasis sistémicas, pero estos síntomas muy raramente son observados en la presentación inicial (12).

## **DIAGNÓSTICO**

### Biopsia

El diagnóstico de cáncer de mama depende del análisis microscópico de células o tejido removido durante la biopsia. Cerca del 60% de las biopsias de pacientes con sospecha de cáncer resultan benignas y el 30% de las biopsias de pacientes con sospecha de lesión benigna resultan malignas (20). Esto confirma la necesidad de realizar biopsia para confirmar el diagnóstico. La obtención de células para su análisis puede ser a través de:

Citología por aspiración con aguja fina

Biopsia con aguja larga

Biopsia abierta

La evaluación adicional para detectar metástasis y opciones terapéuticas se discute con el paciente después que el diagnóstico histológico o citológico de cáncer se ha establecido.

### Ultrasonido

Es efectuado para diferenciar lesiones quísticas de lesiones sólidas. Aunque no es una prueba diagnóstica, puede revelar lesiones altamente sugestivas de malignidad tales como márgenes irregulares o lesiones pequeñas sólidas asociadas. Puede detectar también la presencia de una masa irregular dentro de un quiste como en el caso del carcinoma intraquístico (20,21).

### Mamografía

Cuando se detecta una lesión sospechosa por mamografía y no puede ser palpada por el clínico debe tomarse biopsia mediante técnica guiada por imagen (20,21).

### Otras modalidades de imagen

Dentro de estas se encuentran la ultrasonografía automatizada de mama, ductografía, resonancia magnética y PET (Tomografía con emisión de positrones). Sin embargo cada una de estas técnicas tiene indicaciones precisas y no son utilizadas de rutina en el diagnóstico de cáncer de mama (22,23).

### Citología

En algunas ocasiones es útil para identificar células malignas procedentes de líquido obtenido por secreción del pezón o bien a través de biopsia por aspiración con aguja fina (24).

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Las lesiones que deben ser consideradas con más frecuencia en el diagnóstico diferencial son: displasia mamaria (enfermedad quística de la mama), fibroadenoma, papiloma intraductal, lipoma y necrosis grasa (25).

## **ESTADIFICACIÓN**

Actualmente la American Joint Committee on Cancer y la Internacional Union Against Cancer han acordado utilizar el sistema de estadificación TNM (Tumor, Nódulos linfáticos y Metastásis) (Anexo 3). La finalidad de utilizar este sistema es ayudar a planificar el tratamiento, ser utilizado como indicador pronóstico y facilitar el intercambio de información entre los centros de tratamiento potenciando la comunicación entre investigadores y clínicos, contribuyendo con ello a la investigación (26,27). Es importante destacar que las modificaciones a esta clasificación se han basado en hallazgos tanto de inmunohistoquímica como de biología molecular, lo cual refleja el avance científico en el entendimiento del cáncer de mama (28).

## **TIPOS PATOLÓGICOS**

Se pueden identificar numerosos subtipos patológicos de cáncer de mama. Estos subtipos se distinguen por su apariencia histológica y patrón de crecimiento

tumoral. En general, el cáncer de mama surge del linaje de células epiteliales de los ductos grandes o medianos (ductal) o bien del epitelio de ductos terminales de los lóbulos (lobular). El cáncer puede ser invasivo o *in situ*. La mayoría de los cánceres surge de los ductos intermedios y son invasivos (ductal invasivo, ductal infiltrante). La mayor parte de los tipos histológicos son meramente subtipos del cáncer invasivo ductal con patrones inusuales de crecimiento (colóide, medular, escirro). El carcinoma ductal que no ha invadido el tejido extraductal se denomina intraductal o ductal *in situ*. El carcinoma lobular puede ser invasivo o *in situ*.

Excepto para los cánceres *in situ*, los subtipos histológicos tienen leves diferencias en cuanto al pronóstico una vez que se ha estadificado la enfermedad. Se han estudiado varios parámetros histológicos, tales como invasión de vasos sanguíneos, diferenciación tumoral, invasión de nódulos linfáticos mamarios y necrosis tumoral, sin embargo ninguno de ellos parece tener un valor pronóstico importante.

Aún cuando los cánceres no invasivos por definición se encuentran restringidos a la membrana basal de los ductos y no tienen la capacidad para extenderse o diseminarse, en pacientes cuyas biopsias muestran cáncer no invasivo intraductal, se ha encontrado en 1-3% de los casos metástasis de células invasivas malignas ductales a los nódulos linfáticos (29,30).

El carcinoma lobular *in situ* es una lesión premaligna que no corresponde a un verdadero cáncer, pero es un factor de riesgo asociado con el desarrollo subsecuente de cáncer invasivo en al menos 20% de los casos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tipos histológicos en cáncer de mama.

<b>Tipo</b>	<b>Frecuencia</b>
Ductal Infiltrante	80-90%
Medular	5-8%
Coloide (Mucinoso)	2-4%
Tubular	1-2%
Papilar	1-2%
Lobular invasivo	6-8%
No invasivo	4-6%
Intraductal	2-3%
Lobular in situ	2-3%
Tipos raros de cáncer	< 1%
Juvenil (secretorio)	
Adenoide quístico	
Epidermoide	
Sudorífero	

Modificado de Lawrence M. **Current medical diagnosis and treatment. Lange.** USA. 2004.pp 680-681.

## **RECEPTORES HORMONALES**

La presencia o ausencia de receptores de estrógenos y progesterona en el citoplasma de las células tumorales es de gran importancia en el manejo de los pacientes con cáncer de mama (30,31).

Los pacientes cuyos receptores son positivos tienen un pronóstico favorable en comparación con los que son receptores negativos. También, los receptores son de gran valor en la elección de terapia adyuvante y para el tratamiento de enfermedad avanzada. Cerca del 60% de los pacientes con metástasis de cáncer de mama responderán a manipulación hormonal si sus tumores contienen células con receptores de estrógenos. Mientras que solo el 5% de los pacientes con metástasis y receptores negativos a estrógenos pueden ser tratados exitosamente en este contexto.

Los receptores de progesterona pueden ser un indicador aun más sensible que los receptores de estrógenos en pacientes que responderán a manipulación hormonal. Cerca del 80% de los pacientes con tumores metastásicos y con

receptores positivos de progesterona mejoran considerablemente con la terapia hormonal adyuvante. Sin embargo, a la fecha no se ha reportado relación de los receptores con la respuesta a quimioterapia (30-33).

El estado de los receptores es valioso no solo en el manejo de la enfermedad metastásica sino también ayuda a seleccionar pacientes para terapia adyuvante. El Tamoxifén es un fármaco utilizado como adyuvante ya que actúa como un antagonista estrogénico en tejido mamario y como un agonista en endometrio y es considerado como "Gold Standard" en tumores de mama con receptores estrogénicos positivos y se ha visto que en tumores con receptores hormonales negativos en tratamiento con quimioterapia, mejora considerablemente la tasa de supervivencia aún en ausencia de metástasis a nódulos linfáticos. El raloxifeno es un fármaco que se comporta como un antagonista estrogénico tanto en tejido mamario como en endometrio y se ha observado puede ayudar a prevenir el cáncer de mama. Otros fármacos que han sido usados con este fin son los inhibidores de la aromatasa, dicha enzima se requiere para la biosíntesis de estrógenos, un ejemplo de éste tipo de fármacos es el anastrozol (34-38).

Para determinar el estado del receptor de estrógenos en el cáncer de mama se realiza en forma rutinaria el análisis por inmunohistoquímica con el principio básico de una reacción antígeno-anticuerpo. El uso de ésta técnica es utilizado para determinar el factor pronóstico de pacientes con cáncer de mama y la probabilidad de respuesta a terapia hormonal (39-41).

### **RECEPTOR HER-2/*neu***

La presencia de receptores HER-2/*neu* positivos en células tumorales mamarias ha tenido implicaciones tanto en la selección de tratamiento, como en el pronóstico y monitorización de los pacientes con cáncer de mama.

Receptores HER-2/*neu* positivos se han asociado con un fenotipo agresivo de las células tumorales, así como con disminución en la tasa de supervivencia y una respuesta adecuada a Trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal que se

une selectivamente al receptor HER-2/neu, inhibiendo el crecimiento celular tumoral (42).

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento puede ser curativo o bien, paliativo. El tratamiento curativo está indicado en pacientes en estadios clínicos I y II de la enfermedad. Los pacientes con tumor localizado pero de gran tamaño (Estadio III) y aun los tumores inflamatorios pueden ser curados con terapia multimodal. El tratamiento paliativo es apropiado para todos los pacientes en estadio IV de la enfermedad y para pacientes previamente tratados quienes desarrollaron metástasis a distancia o quienes presentan cánceres locales irresecables.

### **Elección de la terapia primaria**

La extensión de la enfermedad y su agresividad biológica son las principales determinantes de la elección de la terapia primaria. La estadificación clínica y patológica ayuda a evaluar la extensión de la enfermedad, sin embargo puede ser altamente imprecisa. Otros factores tales como la citometría de flujo de DNA, grado tumoral, estado de receptores hormonales y amplificación oncogénica pueden tener valor pronóstico pero no son importantes en determinar el tipo de terapia local. Cerca de dos terceras partes de los pacientes eventualmente manifiestan enfermedad residual distante después de la terapia primaria, por lo que hay una tendencia a pensar que efectivamente el cáncer mamario está diseminado al momento del diagnóstico (43,44).

Existe una controversia en cuanto a la elección de la terapia primaria para el cáncer mamario en los estadios I, II y III, sin embargo actualmente la elección estándar en estadios I y II es la resección quirúrgica.

Como parte del tratamiento es necesario contar con terapia adyuvante dependiendo del tipo de tumor, riesgo estimado y tiempo de presentación, esto con la finalidad de evitar los riesgos de micrometástasis y recurrencia, ya que se

estima que ésta última es de entre el 70 y el 40 por ciento a los 15 años después del diagnóstico en caso de no recibir terapia adyuvante (45)

### **Terapia conservadora**

El tamaño tumoral es la mayor consideración para la conservación de la mama. Para llevar a cabo un resultado cosméticamente aceptable el paciente debe tener una mama de tamaño suficiente para escindir un tumor de 4 cm sin deformidad considerable. Un tumor multifocal es una contraindicación relativa para cirugía conservadora (30, 45-48).

La disección axilar es valiosa en la prevención de recurrencias axilares, en estadificación del cáncer y en la elección del tratamiento, sin embargo en la actualidad se prefiere la biopsia de nódulo sentinela como medio de estadificación. Incluso se han realizado múltiples investigaciones para identificar pacientes con alto riesgo de enfermedad metastásica a través de marcadores moleculares a diversos niveles (DNA, RNA y proteico) capaces de detectar micrometástasis en biopsias de médula ósea, ganglio sentinela o sangre periférica (30,49)

### **PRONÓSTICO**

El estadio del cáncer de mama es el más directo indicador de pronóstico. Los pacientes con enfermedad localizada a la mama y sin evidencia de diseminación regional después de examen histopatológico de los nódulos linfáticos tienen el pronóstico más favorable. El estado de los nódulos linfáticos es el factor pronóstico más estudiado y correlacionado con la tasa de supervivencia en todos los tumores mamarios. Además el incremento en el número de nódulos axilares involucrados correlaciona directamente con las tasas de baja supervivencia (30,50).

El estado de los receptores de estrógeno y progesterona son variables pronósticas cuando los pacientes con tumores receptor hormonal negativos y sin evidencia de metástasis a nódulos linfáticos axilares tienen una alta tasa de recurrencia que los



pacientes con tumores receptor hormonal positivos y sin metástasis regional (31,32).

El subtipo histológico del cáncer de mama, por ejemplo medular, lobular y coloide parece tener poca significancia en el pronóstico ya que estos tumores son verdaderamente invasivos. La citometría de flujo de células tumorales para analizar índice de DNA y frecuencia de la fase S ayudan en el pronóstico. Los tumores con marcada aneuploidía tienen un mal pronóstico. La presencia de receptores HER-2/*neu* positivos se ha asociado con incremento de recurrencia y mal pronóstico (30,48

Cuando el cáncer está localizado a la mama, sin evidencia de diseminación después de examen histopatológico, la tasa de curación clínica con el tratamiento estándar es de 75-90%. Excepciones a esta generalización son las relacionadas al contenido de receptores hormonales del tumor, tamaño tumoral, resistencia del hospedero o enfermedad asociada. Los pacientes con tumores mamográficamente pequeños y receptores hormonales positivos y sin evidencia de diseminación ganglionar linfática tienen una tasa de supervivencia de 90% a 5 años. Cuando los nódulos linfáticos se encuentran afectados, la tasa de supervivencia cae al 40-50% a 5 años y alrededor de 25% a 10 años (Tabla 3).

En general el cáncer de mama parece ser de mayor malignidad en mujeres jóvenes que en adultas y esto puede estar en relación al hecho que pocas mujeres jóvenes tienen receptores hormonales positivos (47,50).

**Tabla 3.** Supervivencia (%) de pacientes con cáncer de mama por estadificación TNM.

<b>Estadio TNM</b>	<b>5 años</b>	<b>10 años</b>
0	95	90
I	85	70
IIA	70	50
IIB	60	40
IIIA	55	30
IIIB	30	20

IV	5-10	2
Todos	65	30

Modificado de Lawrence M. **Current medical diagnosis and treatment. Lange.** USA. 2004.pp 680-681.

## **ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA**

### **ESTRÓGENOS**

Existe suficiente evidencia de la participación de los estrógenos en el crecimiento y proliferación celular tumoral. Se sabe que los estrógenos influyen en la expresión de un amplio rango de genes por diferentes mecanismos.

Las hormonas esteroideas sexuales son sintetizadas a partir del colesterol y son secretadas primariamente en ovarios con contribuciones de la placenta, tejido adiposo, testículos y glándulas adrenales; después de la menopausia la biosíntesis de los estrógenos por los ovarios es mínima y los estrógenos circulantes provienen principalmente de la aromatización periférica de andrógenos adrenales a través de la aromatasa que transforma androstenediona en estrona (E1) (43,51).

El estrógeno intracelular predominante es el 17 $\beta$ -estradiol (E2), el cual en la glándula mamaria promueve la proliferación celular tanto en forma normal como en el epitelio transformado al modificar la expresión de genes hormono-dependientes los cuales se encuentran involucrados en el ciclo celular y/o apoptosis (43).

Los estrógenos son necesarios para el desarrollo normal de la glándula mamaria, sin embargo se ha observado que la exposición acumulada a ellos durante la vida de una mujer es un factor de riesgo para neoplasia (52). Los estrógenos tienen un papel importante en la persistencia, desarrollo y maduración de tumores hormono-dependientes como lo es el cáncer de mama (51).

Se piensa que la biosíntesis local de los estrógenos desempeña una parte fundamental en el desarrollo del cáncer de mama hormono-dependiente.

Los estrógenos pueden actuar a través de dos vías, la no genómica en la cual no existe la unión al receptor de estrógenos y la vía genómica que depende de unión a receptores de estrógenos (53).

### **Vía No Genómica**

Los estrógenos pueden ejercer acciones rápidas mediante el inicio de la señalización atribuido a la membrana celular sin requerirse la unión ligando-receptor ya que ésta conduce a modificaciones a nivel tanto estructural como funcional de proteínas celulares por activación de vías como son ERK/MAPK, p38/MAPK, PI3k/AKT, PLC/PKC. (53,54).

### **Vía Genómica**

En este caso para que los estrógenos ejerzan su función se requiere de la unión a receptores de estrógeno para que se pueda iniciar la acción mediante la inducción de un cambio conformacional, lo que da lugar al aumento de la transcripción de genes específicos.

### **RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER)**

El estado del receptor de estrógenos se ha encontrado como un importante predictor de supervivencia y de respuesta a la hormonoterapia, además se ha descrito una fuerte asociación entre cáncer de mama y una elevación persistente de los niveles sanguíneos de estrógenos (31,32). Dicho receptor pertenece a una superfamilia de receptores nucleares y se han identificado dos receptores de estrógenos: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (51, 54-55).

El receptor de estrógenos alfa se encuentra localizado en 6q25.1 y está formado por una cadena de 595 aminoácidos, mientras que el receptor de estrógenos beta se encuentra en el cromosoma 14q23.2 que codifica para una cadena de 530 aminoácidos (51-52, 54,56-58).

El gen del ER $\alpha$  contiene 7 exones de 20 kb mientras que el gen del ER $\beta$  contiene 8 exones de aproximadamente 61.2Kb (52,55).

Los receptores se encuentran conformados por seis dominios denotados de la letra A a la F, ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) el cual se une a secuencias específicas del promotor o a los sitios "enhancer" de genes regulados por estrógeno. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el

dominio de unión al ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos. Dicho LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación llamado AF-2. Entre DBD y LBD se encuentra la región variable conocida como *h*sagra. La región amino-terminal contiene una región denominada AF-1 y es ligando-independiente (51, 54).

La expresión de los receptores varía dependiendo del tejido, ER $\alpha$  se expresa predominantemente en útero, mama, ovario, hígado y sistema nervioso central, mientras que ER $\beta$  se expresa en mayor grado en hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (51).

A pesar de la importancia de los receptores de estrógenos en la inducción de la proliferación de las células mamarias normales y en el desarrollo de cáncer de mama, el mecanismo aún no se comprende plenamente (59), sin embargo parte de ellos ya han sido descritos.

La activación del receptor inicia al unirse a su ligando generando la disociación de proteínas de estrés y la dimerización lo que induce un cambio conformacional del complejo. Las proteínas de estrés estabilizan al receptor cuando se encuentran en estado inactivo protegiéndolo contra la degradación por proteasas (58).

Algunos mecanismos propuestos para la activación transcripcional por el receptor de estrógenos son la activación por factores de crecimiento, interacción por proteínas correguladoras que actúan como correpresores o bien como coactivadores así como la activación del receptor independiente de su unión a ligando (36,51,55,60-61). Sin embargo los mecanismos más estudiados hasta el momento son los que describen que una vez que se forma el complejo hormona-receptor se encuentran pueden encontrarse una de dos rutas para que se lleve a la activación transcripcional, una en la cual se encuentran implicados los elementos de respuesta a estrógenos y otra alternativa en la cual se encuentran involucrados factores de transcripción (62).

Los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) son secuencias palindrómicas con tamaño aproximado de 17 pb que han sido localizadas en promotores de genes. Los receptores de estrógenos al unirse a EREs dan lugar a una curvatura del DNA sobre el surco mayor facilitando con ello interacciones entre los

componentes del complejo de transcripción y el promotor del gen, además de permitir la entrada de correguladores los cuales promueven el inicio de la transcripción (51,54,63).

La vía alterna de acción de los receptores de estrógenos independiente a la interacción con EREs inicia después de la unión ligando-receptor en la cual se requieren factores de transcripción que a su vez se unen al DNA para poder ejercer su función a través de ellos, ejemplos de dichos factores de transcripción son AP-1 y Sp1 (62).

Finalmente se considera que los receptores de estrógeno actúan como factores de transcripción que regulan la expresión génica y ciclo celular.

## **CICLO CELULAR**

Se conocen genes importantes relacionados con el control de la proliferación y progresión del ciclo celular los cuales se agrupan de acuerdo a su función en: oncogenes, genes tumor supresor y genes regulan el ciclo celular, de algunos de ellos se conoce su participación en cáncer de mama el cual en algunas ocasiones puede ser de tipo familiar.

Los oncogenes promueven normalmente el ciclo celular y al mutar, amplificarse, translocarse o desmetilarse pueden producir una proliferación celular excesiva y descontrolada, dichos oncogenes pueden pertenecer a la familia de factores de crecimiento, receptores de superficie celular, componentes de transducción de señales intracelulares o ser componentes de la red de ciclinas.

Los genes tumor supresor se encargan de reconocer el daño en el DNA, de desencadenar los mecanismos de reparación y en caso de ser muy grave la alteración de activar la vía de apoptosis o muerte celular programada evitando que se perpetúe la mutación, ejemplos de genes tumor supresor son *TP53*, *BRCA1* Y *BRCA2*.

*TP53* (locus 17p13.1) frecuentemente se encuentra mutado en el Síndrome de Li-Fraumeni y en varios tumores humanos, entre ellos cáncer de mama (64-66). *BRCA1* (locus 17q21) y *BRCA2* (locus 13q12.3) presentan penetrancia elevada y riesgo incrementado de cáncer de mama y de ovario (66).

Cuando el daño al DNA no es detectado o reparado hay alteraciones importantes en el material genético que activan la apoptosis como medio para evitar la acumulación de mutaciones (67-69).

## **APOPTOSIS**

La apoptosis es una vía de muerte celular activa, metabólica y genéticamente codificada. Esta ocurre bajo condiciones fisiológicas o patológicas. La apoptosis es un mecanismo de protección que dirige la lisis de células infectadas por virus, células extrañas o neoplasia incipiente. La pérdida de la regulación de apoptosis está involucrada en cáncer (70-71).

Todas las vías de apoptosis convergen en la activación de caspasas, proteasas que llevan a cabo en forma eficiente la muerte celular. Existen dos vías principales que activan las caspasas, la extrínseca iniciada por receptores de superficie celular y que conducen directamente a la activación de la caspasa 8, y la intrínseca que está regulada por la mitocondrial. La vía mitocondrial de la apoptosis es mediada por la familia de proteínas BCL-2 (72).

Existen numerosos factores ambientales que pueden activar la apoptosis y otros factores que pueden antagonizar la apoptosis. Los activadores de la apoptosis incluyen el factor de necrosis tumoral alfa, Fas ligando, factor de crecimiento transformante beta, BAX y otros miembros de la familia de genes pro-apoptóticos BCL-2 así como glucocorticoides (73-75).

## **PROTEÍNAS BCL-2**

BCL-2 y ciertas proteínas citoplasmáticas son elementos reguladores de apoptosis. Se han identificado al menos 15 miembros de la familia BCL-2 en mamíferos. Todos los miembros poseen al menos uno de cuatro motivos conocidos como dominios de homología a BCL-2 denominados BH1 a BH4. La familia de proteínas BCL-2 puede ser dividida en 2 subfamilias, anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. La subfamilia anti-apoptótica comprende BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 y A1 (BFL-1) (76). Estas proteínas muestran secuencias homólogas en alguna de las regiones BH 1-4. En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas pueden

ser divididas en dos grupos de acuerdo a la función y el número de dominios BH que poseen. BAX, BAK, MTD (BOK) y BCL-rambo son proteínas pro-apoptóticas que contienen dominio BH 1-3 y son conocidas como proteínas pro-apoptóticas multidominio o efectoras. Las proteínas pro-apoptóticas restantes contienen solo uno de los tres dominios BH y son conocidas como proteínas BH3-only (77). Estas últimas pueden ser activadas por muchos estímulos nocivos -incluyendo daño a DNA, cascada de factores de crecimiento y activación oncogénica- vía mecanismos que incluyen activación transcripcional, modificaciones de localización celular y postraduccionales (78-79). Esta familia consiste de un gran número de miembros, por ejemplo BAD, BID, BIM (BOD), HRK (DP5), NOXA, BLK, BNIP3 (NIX), BNIP3L, PUMA, P193, BMF, BCL-G y BIK (NBK), (78).

### **BIK**

*BIK* se ha localizado en 22q13.3, consta de 5 exones y 4 intrones y se extiende en cerca de 19 Kb. El dominio transduccional y el dominio BH3 fueron localizados en el exón 2 y 3 respectivamente. Codifica una proteína de 160 aminoácidos con función proapoptótica. La proteína cuenta con un dominio funcional denominado BH3 y contiene un dominio transmembranal c-terminal (80-81). El dominio BH3 juega un papel central en inducir la muerte celular y dimerización proteica. Al parecer *BIK* induce apoptosis por la vía mitocondrial (82-84). *BIK* tiene fuerte actividad pro-apoptótica en un gran número de tipos celulares *in vitro*. Se ha reportado su participación en apoptosis en células de melanoma humano (85) y se ha encontrado mutado en cáncer glial, colorectal, mieloma y linfoma de células B (86-88). A la fecha se han realizados estudios *in vitro* a fin de identificar sustancias que aumenten los niveles de *BIK*, encontrándose que diversos inhibidores del proteasoma logran incrementar su expresión (89-92). Además de que el gen ha sido introducido en diversos vectores a fin de determinar su utilidad en terapia génica observándose que las células tumorales disminuyen su índice de crecimiento y proliferación (93-96). Se realizó un estudio en donde se introdujo una forma mutada de *Bik* con un promotor de topoisomerasa alfa II el cual se encuentra selectivamente activado en células de cáncer de mama mediante

liposomas en diversos modelos animales, logrando suprimir el desarrollo de células tumorales mamarias (97).

*BIK* también se ha involucrado en etapas del desarrollo como la formación testicular y la espermatogénesis en donde la apoptosis juega un papel muy importante (98). Además de las propiedades pro-apoptóticas de este gen se ha visto que juega un papel importante en homeostasis tisular, inmunidad y supresión tumoral, al igual que otros miembros de la familia BCL-2 que comparten el dominio BH3 con *BIK* (99).

En ratones se ha reportado expresión del gen homólogo a *BIK* en diversas células hematopoyéticas y en células epiteliales (100). En estudios de tejidos en humano, Verma y colaboradores reportaron expresión del gen *BIK* en corazón y músculo esquelético (101), sin embargo, Daniel PT y colaboradores (102) realizaron estudios en donde se mostró que *BIK* tiene una distribución de expresión restringida, siendo mayormente detectada en células epiteliales. En su estudio se demostró expresión de *BIK* en riñones, páncreas y niveles bajos en placenta, pulmón, hígado, próstata y testículos. Mientras que no se encontró expresión del gen en corazón, cerebro, músculo esquelético, bazo, timo, ovario, intestino delgado, colón y linfocitos de sangre periférica.

Se ha demostrado que el mRNA de *BIK* está expresado ectópicamente en algunas líneas celulares de tumores, por ejemplo fue detectado en células EBV (Virus de Epstein Barr) positivas tipo III de Linfoma de Burkitt y SW480 de adenocarcinoma de colón. La expresión del gen fue detectada en epitelio pero no en el compartimiento linfóide.

En carcinoma renal de células claras se ha encontrado pérdida de la expresión del gen *BIK*. De estas células con pérdida de la expresión la mayoría presentaron deleciones en alguna parte del gen y una minoría presentó mutaciones (103).

## **RELACIÓN ENTRE *BIK* Y ESTRÓGENOS**

Se ha sugerido que puede existir una relación entre los niveles de estrógeno, la expresión del gen *BIK* y mecanismos de apoptosis, ya que algunos tumores mamarios en humanos requieren estrógenos no solo para su proliferación sino



también para su permanencia. Hur y colaboradores reportaron que tanto el transcrito de *BIK* como la proteína proapoptótica BIK eran fuertemente inducidos por la deprivación estrógena o exposición a Fulvestrant en células de cáncer de mama MCF-7/BUS. La inducción de BIK precedió a la apoptosis, misma que fue bloqueada por zVAD-fmk, un inhibidor de pancaspasas. La cantidad de otras proteínas relacionadas a BCL-2 tales como BCL-2, BCL-xL o BAX mostraron solo cambios marginales en la presencia o ausencia de estrógenos o antiestrógenos. La supresión de la expresión de BIK al usar pequeño RNA de interferencia bloqueó en forma efectiva la apoptosis inducida por Fulvestrant en células de cáncer de mama. Sus resultados indicaron que BIK es inducido en células MCF-7/BUS en la ausencia de señalización de estrógenos y que juega un papel crítico en la apoptosis inducida por antiestrógenos en células de cáncer de mama (104).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente el cáncer se considera un problema de salud pública a nivel mundial y dentro de esta patología el cáncer de mama ocupa un lugar preponderante en cifras de mortalidad. Se encuentran en investigación los mecanismos moleculares que intervienen en la fisiopatología de esta entidad con el fin de realizar diagnósticos tempranos así como para establecer medidas de prevención primaria que lleven a mejorar los niveles de morbilidad y mortalidad.

Hay evidencia de que algunos tumores dependientes de estrógenos requieren estrógenos no solo para proliferar sino también para que éstos permanezcan. Existe el reporte de la inducción de la expresión de *BIK* en células tumorales mamarias cuando hay deprivación de estrógenos y con el uso de agentes antiestrogénicos en estudios *in vitro*, lo cual sugiere puede haber una relación entre la expresión de los receptores de estrógeno, la expresión del gen *BIK* y la apoptosis en células de pacientes con cáncer de mama. Es primordial tomar en cuenta los genes que se encuentran asociados a esta patología con el fin de descartar o confirmar su implicación para poder en un momento dado utilizarlos para mejorar la detección, el tratamiento y el pronóstico de las pacientes considerando que a nivel mundial las técnicas de biología molecular han venido a revolucionar la medicina.

## **JUSTIFICACIÓN**

No se ha reportado a la fecha un estudio que determine si en pacientes con cáncer de mama hay correlación entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos. Es importante establecer si existe alguna correlación entre la expresión de *BIK* y los receptores de estrógeno ya que ello podría dar la pauta para considerar el uso de la expresión de este gen tanto como factor pronóstico y/o como blanco terapéutico.

## **OBJETIVO**

Correlacionar la expresión de *BIK* con la expresión del receptor de estrógenos a en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con Cáncer de mama.

## **HIPÓTESIS**

Existe una correlación de Spearman de al menos -0.7 entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de los receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Observacional, transversal y analítico.

## **LUGAR DEL ESTUDIO**

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, Servicio de Tumores de Mama y Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología del CMN SXXI, IMSS.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Muestras de tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas

## **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **Criterios de Inclusión**

-Tejido de mama con alta sospecha de cáncer mamario procedente de mujeres con edades comprendidas entre 30 y 80 años de edad, mexicanas en por lo menos tres generaciones previas, sin tratamiento al momento de la toma de muestra y que acepten participar voluntariamente en el estudio.

### **Criterios de Exclusión**

-Muestras de tejido mamario neoplásico de mujeres cuyo cáncer primario sea de diferente localización.

### **Criterios de Eliminación**

-Muestra insuficiente para realizar extracción de RNA y RT-qPCR  
-Muestras de mujeres en quienes al efectuar el estudio histopatológico no se confirmó el diagnóstico de cáncer de mama, sin embargo se consideraron como controles negativos de las técnicas de biología molecular.

## **CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA**

Una de las variables a correlacionar fue de tipo cuantitativo continuo (Ct) y la otra de tipo ordinal (porcentaje) por lo que el estadístico apropiado para demostrar asociación entre la expresión del gen *BIK* en células neoplásicas mamarias y expresión de receptores de estrógenos de mujeres con cáncer de mama fue el Coeficiente de correlación de Spearman.

No hay reportes en la literatura sobre la correlación en tejido mamario neoplásico entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de receptores estrogénicos, sin embargo dado un reporte en donde se refiere que hay inducción de la expresión de *BIK* con la privación estrogénica, planteamos una magnitud de la correlación de -0.70 entre las dos variables, indicando así que a mayor expresión del gen *BIK* menor expresión de receptores estrogénicos en tejido tumoral mamario o viceversa.

El  $\alpha$  utilizado para el cálculo de tamaño de muestra fue de 0.05, con un poder del 80%, con un contraste de hipótesis con planteamiento unilateral.

$$n = \left( \frac{z_{1-\alpha} + z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3$$

Sustituyendo los valores y efectuando el cálculo se obtuvo una  $n= 11$  muestras de tejido mamario neoplásico a las cuáles se les efectuó determinación de la expresión del gen *BIK* por RT-qPCR y de receptores estrogénicos por inmunohistoquímica.

## **MUESTREO**

El muestreo fue de tipo no probabilístico de casos consecutivos y de cada una de las participantes se tomaron por lo menos 30 mg de tejido tumoral mamario para efectuar la determinación de la expresión del gen *BIK* y otros 30 mg fueron enviados al servicio de patología del Hospital de Oncología del CMN, SXXI, IMSS

para el diagnóstico histopatológico, estadificación y determinación de la expresión de los receptores de estrógenos por inmunohistoquímica. Cabe mencionar que la biopsia y la determinación de estrógenos fueron parte del procedimiento de rutina para establecer el diagnóstico y normar el tratamiento del cáncer de mama en derechohabientes que acudieron al servicio de Tumores de mama en el Hospital de Oncología del CMN, SXXI, IMSS.

### **VARIABLES DEL ESTUDIO**

**Tabla 4.** Variables del Estudio.

Variable	Definición Operacional	Escala de medición	Unidad de medición
Expresión de receptores de estrógenos	Porcentaje de receptores de estrógenos detectados por inmunohistoquímica en biopsia de tejido mamario.	Ordinal	Porcentaje
Expresión del gen <i>BIK</i>	Cantidad relativa de expresión del gen <i>BIK</i> medida en Cts mediante RT-PCR en tiempo real.	Cuantitativa continua	Ct (Ciclo en el cual la fluorescencia de la muestra amplificada cruza el punto de corte por arriba de la señal de fondo. Está relacionado directamente con el número de copias amplificadas. Un Ct menor indica mayor número de copias ya que la amplificación ocurre más temprano, un Ct mayor indica menor número de copias ya que la amplificación ocurre más tarde.)

## **ASPECTOS ÉTICOS**

De acuerdo a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título segundo, Capítulo I, artículo 17 este estudio se clasificó como una investigación con riesgo mínimo. Se utilizó la carta de consentimiento informado del proyecto titulado *Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama* (Anexo 4).

## RESULTADOS

Es conveniente resaltar que además de la toma de las 11 muestras se realizaron 2 más dando un total de 13 tomas de biopsia, lo anterior considerando que algunas de las muestras pudieran resultar negativas a cáncer y como ya se indicó se tomaron como controles negativos al momento de realizar las técnicas de biología molecular.

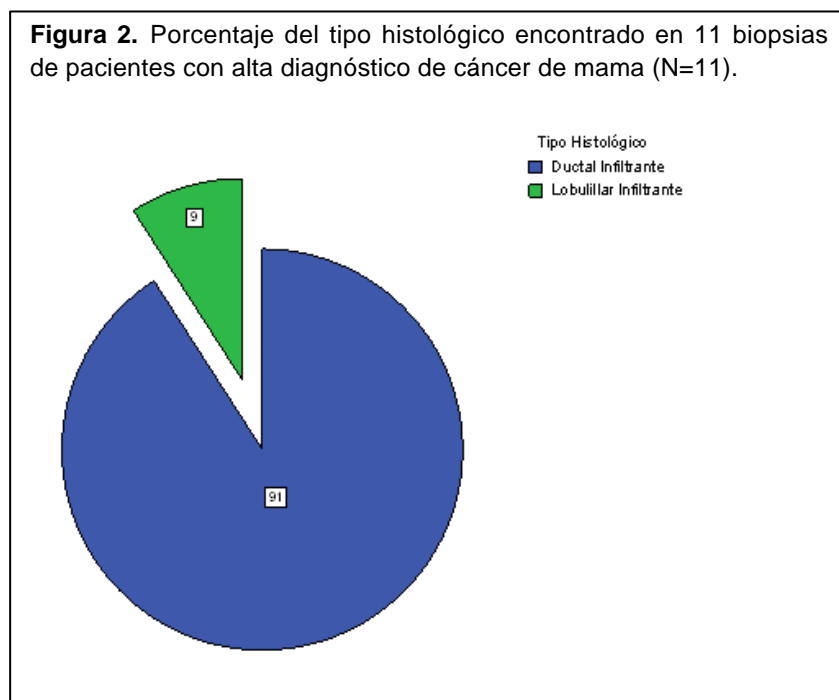
De las 13 muestras obtenidas por biopsia en 2 no se confirmó el diagnóstico de cáncer de mama y los diagnósticos correspondieron a alteraciones benignas de la mama (fibroadenoma mamario y mastopatía fibroquística). (Figura 1)



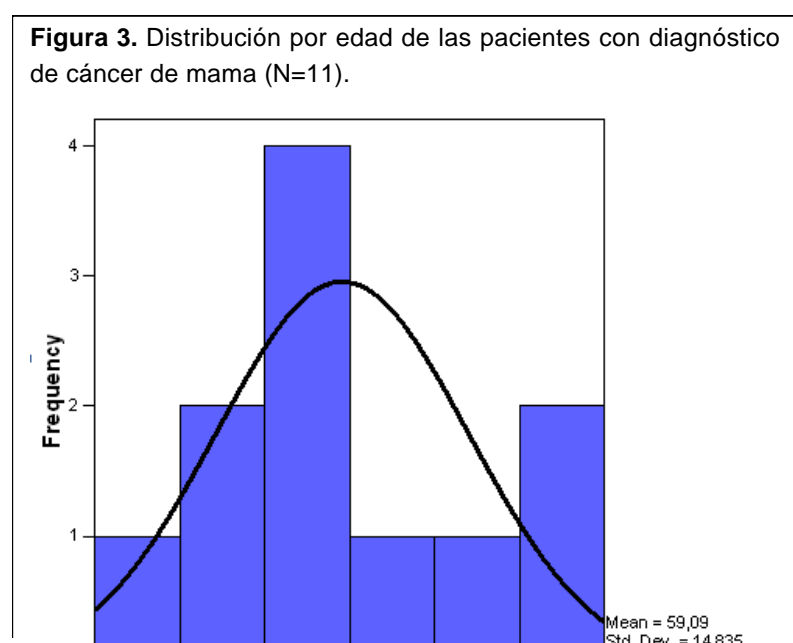
En cuanto al diagnóstico histopatológico de las 11 muestras obtenidas positivas a cáncer de mama se muestra que la mayoría presentaron el tipo histológico ductal



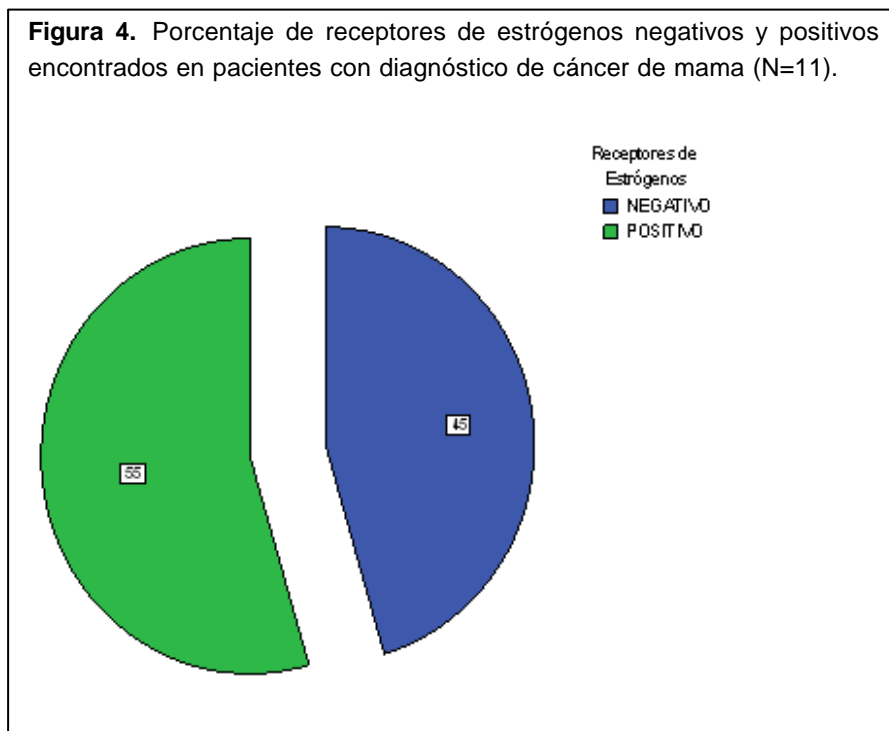
infiltrante como también ya ha sido reportado previamente en la literatura (Figura 2)



La edad de las 11 pacientes con muestras positivas a cáncer de mama se observó que el promedio de edad fue de 59.09 años con un pico entre los 50 y 60 años de edad y otro en mayores de 80 años, lo cual corrobora la distribución de la enfermedad reportada en la literatura (Figura 3).



De las 11 muestras positivas a cáncer de mama se observó que el 55 % presentó receptores de estrógenos a positivos y el 45% presentó receptores negativos lo cual concuerda con los datos reportados en estudios previos (Figura 4)



#### **Muestras de tejido mamario neoplásico**

Las muestras fueron obtenidas a través de la biopsia realizada para la confirmación histopatológica inicial. Cada una de las muestras fue colocada en nitrógeno líquido para su transporte y posteriormente se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las muestras fueron seleccionadas para su análisis por confirmación

histopatológica de cáncer de mama por dos patólogos demostrando que las muestras contenían al menos 70% de células tumorales. Secciones representativas de cada caso fueron embebidas en parafina para tinción con hematoxilina y eosina para evaluar el diagnóstico histopatológico usando los criterios del American Cancer Committee y para su uso en ensayos de inmunohistoquímica.

### **Extracción de RNA**

*Descripción de la extracción de RNA total de tejido tumoral mamario fresco:*

Se pulverizó tejido en nitrógeno líquido con mortero y pistilo previamente esterilizado y sin RNasas.

Se enfrió tubo Eppendorf en Nitrógeno líquido.

Se Colocó el tejido pulverizado en el tubo.

Se agregó 600  $\mu$ L de RLT y se homogenizó con jeringa y aguja pasándolo por lo menos 5 veces.

Se centrifugó 3 minutos a 12 000 RPM y se obtuvo supernadante colocándolo en nuevo tubo Eppendorf.

Se agregó 700  $\mu$ L de alcohol absoluto al 70% y se mezcló por pipeteo.

Se transfirió el contenido a una columna RNAeasy mini.

Se centrifugó 15 segundos a 12,000 rpm y se quitó el líquido del tubo de recolección transparente.

Se adicionó un volumen de 700  $\mu$ L de RW1 a la columna y se centrifugo 15 segundos a 12,000 rpm.

Se desechó el tubo de colección con el líquido recolectado.

Se colocó la columna en otro tubo de colecta de 2 mL nuevo y se agregó 500  $\mu$ L de RPE a la columna.

Se centrifugó 15 segundos a 12,000 rpm.

Se desechó el líquido.

Se agregó nuevamente 500  $\mu$ L de RPE a la columna y se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm.

Se desechó el tubo de colección y se colocó la columna en un tubo nuevo y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm para eliminar residuos de RPE.

Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 40  $\mu$ L de agua libre de RNasa en la membrana blanca y se cerró el tubo. Se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm.

#### *Confirmación de integridad del RNA Total mediante la elaboración de Gel de Agarosa:*

Se lavó la cámara de electroforesis con NaOH 10N por 2 horas y se enjuagó con agua destilada antes de su uso.

Se colocó 50 mL de TBE 1X y 1 g de agarosa grado molecular en vaso de precipitado.

Se fundió la agarosa a aproximadamente 50°C.

Se agregó 3  $\mu$ L de bromuro de etidio (concentración 1  $\mu$ g/mL) y se homogenizó.

Se colocó en la cámara de electroforesis, se dejó polimerizar.

Se agregó amortiguador TBE 1X hasta que se cubrieran ligeramente los pozos.

Se cargó 2  $\mu$ L de muestra mezclada con 1  $\mu$ L de azul de bromofenilo (6X).

Se separaron los ácidos nucleicos mediante 70 Volts durante 120 minutos.

Se visualizó el gel a través de transiluminador de luz ultravioleta (Mighty bright, Hoefer Scientific Ins<sup>TM</sup>).

#### *Cuantificación de RNA con espectrofotómetro:*

Una alícuota de RNA total (1  $\mu$ L) se analizó en espectrofotómetro a 260nm y 280 nm (NanoDrop ND-1000).

### **Transcripción Reversa**

Se realizó la transcripción reversa a partir del RNA total extraído de tejido mamario neoplásico con una concentración de 200ng/ $\mu$ L por cada muestra, usando el Kit

comercial Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life Technologies) con las siguientes especificaciones:

En un tubo de 0.2 mL se colocan:

componente	Volumen
Oligonucleótido (0.5µg Oligo (dT) <sub>20</sub> )	1µL
Mezcla de dNTP (10mM)	1µL
RNA (100ng)	xµL de acuerdo a la concentración
Agua DEPC	Ajustado a 10µL

Se desnaturalizó el RNA por incubación a 65 °C en un termociclador (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®) durante 5 minutos y se colocó en hielo.

Se agitaron en vortex y centrifugan brevemente todos los reactivos durante 5 segundos antes de usar.

Se preparó una mezcla maestra en hielo con todos los reactivos calculados para 15 reacciones. El RNA y agua se agregaron a cada uno de los tubos en las cantidades previamente calculadas para colocar 100 ng/µL de RNA en cada reacción.

En un tubo separado se preparó una Master Mix adicionando cada componente en el siguiente orden que aparece en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Preparación de Master Mix en tubo separado.

Componente	Volumen
10 X RT Buffer	2µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4µL
0.1 M DTT	2µL
RNasa OUT	1 µl

Se agregaron 9 µL de este mix a cada tubo, se mezcló gentilmente y se colectó por centrifugación breve.

Se Incubó a 42 °C por 2 minutos.

Se agregó 1 µL de SuperScript II RT y se incubó a 42 °C por 50 minutos

Se terminó la reacción a 70 °C por 15 minutos y se colocó en hielo.

Se colectó la reacción por centrifugación breve, se adicionó 1µL de RNasa H a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37 °C

Se almacenaron las reacciones de síntesis de cDNA a –70 °C hasta su uso.

#### *Diseño de Oligonucleótidos:*

Los primers fueron diseñados con el programa en línea D-LUX Designer (Invitrogen life Technologies) usando las secuencias reportadas en Gen Bank como sigue: *HPRT* (NM000194) Forward 5'GCTGAGGATTTGGAAAGGGTGT3', y Reverse 5'cgagatCCATCTCCTTCATCACATCTcG3' marcado con fluoroforo JOE, y para el gen *BIK* (U34584) Forward 5'cgaagtGGACCCTATGGAGGACTTcG3' marcado con fluoroforo FAM y Reverse 5'CCTGAGGCTCACGTCCATCTC3'.

#### **qPCR**

Se realizaron ensayos de PRC en tiempo real (qPCR) siguiendo las instrucciones sugeridas en el manual de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen life Technologies) así como de LUX (Light Upon eXtension) Fluorogenic Primers Instrument Protocols (Invitrogen life Technologies) para el instrumento de qPCR Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). La amplificación se llevó a cabo por triplicado en un sistema duplex (ambos genes amplificados en el mismo tubo) para el gen control *HPRT* y para el gen blanco *BIK* en el mismo tubo. El Rotor-Gene 3000 fue programado como sigue: UDG Reaction 50°C por 2 minutos, UDG Inactivation/template denaturation 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de tres segmentos de amplificación (5 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C con adquisición y 10 segundos a 72°C) y un ciclo de análisis de curva melting 60-95°C con un ramp time de 1°C/step (default: wait 60 sec on first step and 5 sec/step after).

1. Se preparó Master Mix de todos los componentes de la reacción, excepto el cDNA como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Preparación de Master Mix de todos los componentes excepto el cDNA.

Componente	Volumen
------------	---------

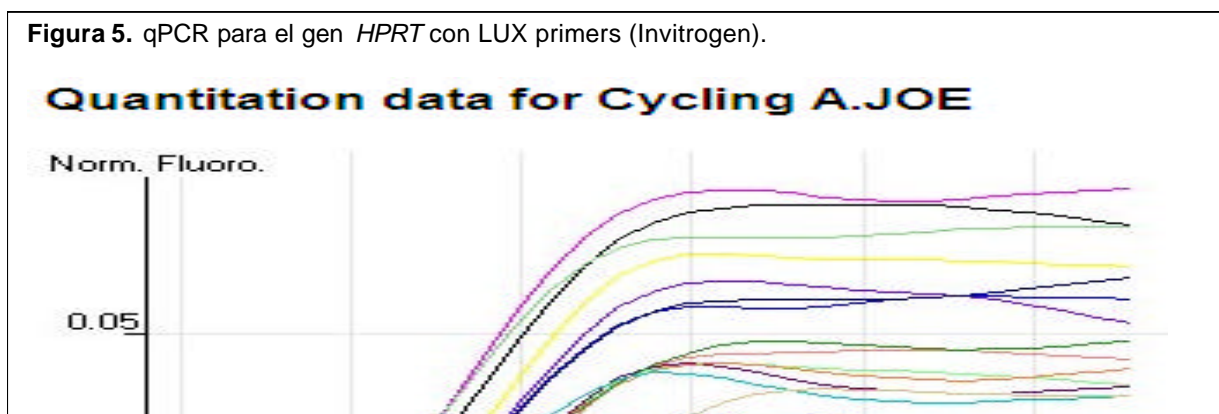
Enzima Platinum	12.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ L
Agua	5 $\mu$ L
Oligo JOE, <i>HPRT</i>	1 $\mu$ L
Oligo <i>HPRT</i>	1 $\mu$ L
Oligo FAM, <i>BIK</i>	1 $\mu$ L
Oligo <i>BIK</i>	1 $\mu$ L
Volumen total	24 $\mu$ L

2. Se agregó 24  $\mu$ L de Master Mix a un tubo de PCR de 0.1 ml de Corbett research, cubriéndose con papel aluminio para evitar exposición a la luz.
3. Se adicionó 1  $\mu$ L de templado de cDNA en el tubo y se tapó.
4. Se mezcló gentilmente asegurándose de que los componentes estuvieran en el fondo.
5. Se colocó la reacción en el aparato de PCR en tiempo real.
6. Se corrió el programa.
7. Se colectaron y se analizaron resultados.

#### *qPCR para el gen HPRT con LUX primers (Invitrogen)*

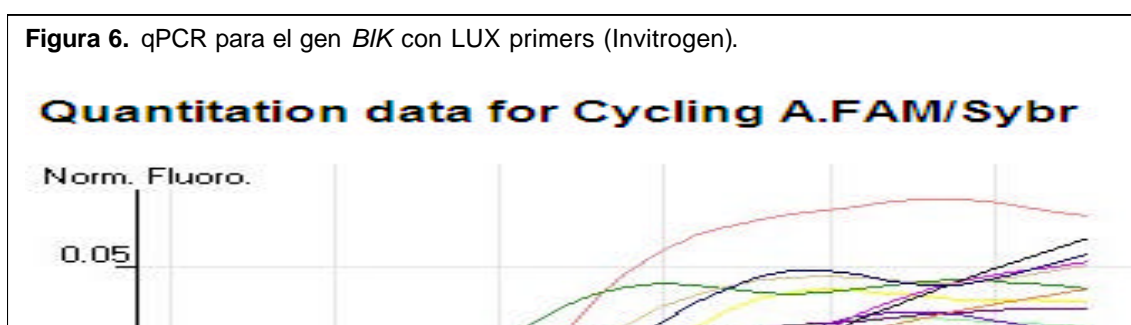
Se muestra la señal de fluorescencia correspondiente a la amplificación del gen control *HPRT* de 11 biopsias de tumor mamario de mujeres con cáncer de mama esporádico, 2 biopsias de tejido mamario de mujeres con alteración benigna de la mama y 3 controles negativos (sin cDNA) (Figura 5)

**Figura 5.** qPCR para el gen *HPRT* con LUX primers (Invitrogen).



qPCR para el gen *BIK* con LUX primers (Invitrogen).

Se muestra la señal de fluorescencia de amplificación del gen *BIK* de 11 biopsias de tumor mamario de mujeres con cáncer de mama esporádico, 2 biopsias de tejido mamario de mujeres con alteración benigna de la mama y 3 controles negativos (sin cDNA).





Los datos del ensayo de qPCR fueron analizados como puntos de datos y normalizados con el gen *HPRT* en forma individual. Los tres replicados de cada muestra fueron promediados y transformados por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Expresión de Receptores de Estrógenos**

Técnica realizada en H. oncología CMN S XXI por el servicio de patología.

La técnica se encuentra basada en el uso del sistema DAKO LSAB + System-HRP con el número de catálogo K0690 (44).

### *Soluciones*

Se procedió a preparar las soluciones PBS, SCOTT y de GILLS utilizando los reactivos como se muestra en las Tablas 7, 8 y 9 respectivamente.

**Tabla 7.** Componentes de la solución amortiguadora PBS 10X pH 7.2.

		1 LITRO	2 LITROS
Cloruro de sodio	NaCl	80 gr	160 gr
Cloruro de potasio	KCl	0.2 gr	0.4 gr
Fosfato de potasio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 gr	0.4 gr
Fosfato de sodio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.4gr	22.8 gr
Fosfato de sodio dibásico. 7 H <sub>2</sub> O (en caso de que se encuentre hidratado)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	21.5gr	43 gr
Aforar con H <sub>2</sub> O destilada		1000 ml	2000 ml

**Tabla 8.** Componentes de la solución de SCOTT.

Agua corriente	1000 ml
Sulfato de Magnesio	16gr (anhidro)
Bicarbonato de sodio 2 gr	(hidratado)

**Tabla 9.** Componentes de la solución de GILLS.

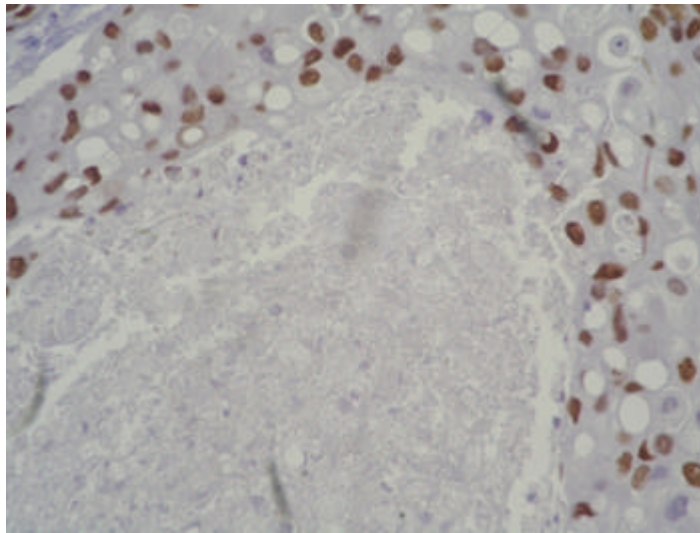
Agua destilada	750 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina	2gr
Sulfato de Al	17.6gr
Yodato de sodio	0.2gr
Acido acético	20 ml

### *Inmunohistoquímica*

1. Se desparafinó con calor a 60 °C por 1 hora
2. Se trabajó en campana de extracción sin dejar secar las laminillas

3. Se realizó la hidratación en tren de alcohol xilol: Xilol 2 cambios de 5 minutos, 2 cambios de alcohol absoluto por 3 minutos y 2 cambios de alcohol del 96°
4. Se colocó en agua destilada
5. Se realizó la recuperación con citratos a pH de 6 por 5 minutos a 125°C a 20 PSI
6. Se conservó 20 min a temperatura ambiente
7. Se enjuagó por 5 minutos en solución amortiguadora PBS
8. Se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 5 minutos
9. Se incubó a temperatura ambiente en anticuerpo primario por 30 minutos
10. Se enjuagó con solución PBS
11. Se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario o Link por 30 minutos
12. Se realizaron enjuagues con solución PBS
13. Se incubó a temperatura ambiente con Estreptavidina por 30 minutos
14. Se enjuagó con solución PBS
15. Se reveló en Diaminobencidina por 10 minutos
16. Se contratiñó con solución de Gills por 1 a 2 minutos
17. Enjuagar con H<sub>2</sub>O
18. Se viró con solución de Scott
19. Se enjuagó con H<sub>2</sub>O no estéril
20. Se deshidrató en tren alcohol-xilol: 2 cambios por 5 minutos en alcohol de 96°, 2 cambios por 3 minutos en alcohol absoluto, se dejó secar por 5 minutos en campana de extracción y 2 cambios en xilol por 5 minutos
21. Se cubrió con resina
22. Se realizó la revisión de laminillas.

A continuación se muestra una de las laminillas correspondientes a una biopsia de tejido mamario neoplásico con receptores de estrógenos a positivos



**Figura 7.** Fotografía de carcinoma ductal infiltrante analizada mediante estudio inmunohistoquímico en el que se muestra la positividad a receptores de estrógenos.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó correlación de Spearman para la variable de porcentaje de receptores de estrógenos a y la variable  $2^{-?Ct}$  de expresión del gen *BIK*. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 12.2 Inc.

**Tabla 10** .Correlación no paramétrica.

### Correlations

			Dosalamen osdelta2	Porcentaje de receptores de Estrógenos
Spearman's rho	Dosalamenosdelta2	Correlation Coefficient	1,000	,623(*)
		Sig. (1-tailed)	.	,020
		N	11	11
	Porcentaje de receptores de Estrógenos	Correlation Coefficient	,623(*)	1,000
		Sig. (1-tailed)	,020	.
		N	11	11

\* Correlation is significant at the 0.05 level (1-tailed).

Dado que a mayor Ct hay retraso en la amplificación por la presencia de baja expresión y/o bajo número de copias, el encontrar una correlación positiva indica que a mayor Ct mayor cantidad de receptores de estrógenos, es decir a menor expresión de *BIK* mayor cantidad de receptores de estrógenos y viceversa, lo anterior con una significancia menor a 0.05.

## DISCUSIÓN

El cáncer de mama se considera una entidad heterogénea tanto clínica como histológicamente, dificultándose con ello la predicción certera de los factores pronósticos y por tanto de su tratamiento. Nuevos fármacos y estrategias terapéuticas podrían ser más éxitos si se entiende la heterogeneidad del cáncer de mama, para lo cual se han realizado avances en los métodos moleculares para comprender mejor los mecanismos implicados en esta enfermedad (105)

Se ha reportado que el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres existiendo su conocida asociación con hormonas esteroideas y siendo por tanto importante la búsqueda intencionada de receptores de estrógenos como un marcador pronóstico, además de que éstos receptores son utilizados como un blanco terapéutico eficaz en el tratamiento antiestrogénico en tumores hormonodependientes (106). Sin embargo se ha observado que puede llegar a presentarse resistencia de novo o adquirida siendo importante conocer los mecanismos moleculares implicados en esta patología para mejorar los estándares de detección oportuna, morbilidad y mortalidad.

Wang y Leung han demostrado la participación de los estrógenos en la supresión de la apoptosis (107,108) y se sabe que la apoptosis puede iniciarse en respuesta a entre otras cosas a daño en el material genético o disrupción del ciclo celular.

Hur y colaboradores (104) en un estudio realizado *in vitro* en cultivos celulares de células MCF-7/BUS describió que cuando existe exposición a agentes antiestrogénicos o bien deprivación de estrógenos se induce la transcripción de *BIK* y la traducción de su proteína, lo que a su vez produce apoptosis. Lo anterior nos sugirió la presencia de una relación entre el receptor de estrógenos y la expresión de *BIK*, es por ello que se planteó la realización de éste trabajo el cual se llevó a cabo en tejido mamario neoplásico obtenido mediante biopsia de

mujeres mexicanas con cáncer de mama con el fin de demostrar o descartar esta asociación a éste nivel.

La prueba utilizada para medir la expresión de los receptores de estrógeno fue la inmunohistoquímica en la cual participaron al menos dos observadores para disminuir el índice de error y todas las muestras se procesaron junto con un control para evitar la presencia de falsos negativos, mientras que para medir la expresión del gen *BIK* la técnica utilizada fué RTqPCR la cual ha sido considerada con adecuados estándares de sensibilidad.

En nuestro estudio encontramos que en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas cuando la expresión del gen *BIK* aumenta disminuye la expresión de receptores de estrógenos, o bien se reportan negativos, mientras que cuando la expresión del gen *BIK* disminuye la expresión de los receptores de estrógenos aumenta o se tornan positivos.

Es trascendente señalar que los resultados del estudio tienen un adecuado nivel de significancia estadística de la correlación positiva encontrada entre la expresión del gen *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas y por tratarse de un estudio de correlación el cálculo del tamaño de muestra es adecuado.

La relación entre la expresión del gen *BIK* y los receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico no había sido reportada previamente en tejido tumoral mamario obtenido directamente por biopsia ya que estudios previos fueron realizados *in vitro* por lo cual se considera que éste es el primer reporte que se realiza a nivel mundial con éstas características.

La limitación encontrada en el presente trabajo es que únicamente se establece la relación entre la presencia de la expresión de *BIK* y los receptores de estrógenos

no permitiendo por el momento establecer las variables modificadoras del efecto, ni la causalidad para lo cual consideramos importante el plantear nuevos estudios.

De acuerdo a lo encontrado en nuevos estudios a futuro pensamos que el gen *BIK* podría ser tomado en cuenta como factor pronóstico o bien como blanco terapéutico temprano al conocerse por un lado la asociación encontrada en éste estudio, y por otro al tener el antecedente de la función proapoptótica descrita para *BIK* como lo reportado por Fu Y y cols en un estudio en el cual al se estableció que GRP78 (una chaperona mayor del retículo endoplásmico) es un regulador río arriba de *BIK* y que al encontrarse elevado bloquea la capacidad de *BIK* para generar apoptosis (109), lo cual nos traduce su importancia.



## **CONCLUSIONES**

Por medio de éste estudio se encontró la existencia una correlación inversa entre la expresión de *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos en tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas la cual es estadísticamente significativa y corrobora nuestra hipótesis planteada además de corroborar lo observado mediante estudios *in vitro*.


Es necesario considerar los resultados obtenidos en éste estudio ya que se sabe que la presencia de receptores de estrógenos se utiliza actualmente como un factor importante tanto en el tratamiento como en el pronóstico en mujeres con cáncer de mama. Lo anterior hace necesario el planteamiento de nuevas hipótesis que involucren el o los mecanismos fisiológicos o bien, fisiopatológicos por el cual la expresión de *BIK* y la expresión de receptores de estrógenos se encuentran relacionados y pudieran llegar a modificarse.

En un momento determinado y de acuerdo a nuevas investigaciones se podría plantear la posibilidad de realizar en el mismo tejido de biopsia que se realiza para el estudio diagnóstico histopatológico confirmatorio de cáncer de mama, la detección de la expresión de *BIK* lo cual de acuerdo a éste estudio surgiere la expresión de receptores estrógenos en dicho tejido y por tanto se acortaría el tiempo de inicio de tratamiento dirigido, debido a que las técnicas utilizadas para su detección en este caso son más rápidas y por tanto esperaríamos mejorar el pronóstico de las pacientes, sin embargo esto tendría su aplicación de acuerdo a estudios que evalúen las modificaciones de ésta correlación, así mismo para su consideración como factor terapéutico considerando la vía de la apoptosis.

Dicho lo anterior se requiere plantear nuevas hipótesis con el fin de que en un momento dado, se pudieran establecer nuevos métodos de diagnóstico y/o tratamiento.

## ANEXOS

### ANEXO 1. APROBACIÓN DE LA COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA CON NÚMERO DE REGISTRO 2007-785-063.



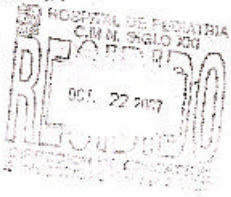
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

**COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Ref. 09-B5-61-2800/2654

Octubre 18, 2007

**DOCTOR DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**  
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría  
Centro Médico Nacional Siglo XXI

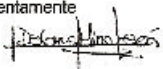


Informo a usted que el proyecto titulado: "Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama" fue sometido nuevamente a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas éticas vigentes y la carta de consentimiento informado es suficientemente explícita, por lo cual tengo el agrado de hacerle saber que con base en las opiniones de los vocales de esta Comisión, se ha emitido dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: 2007-785-063.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar semestralmente a esta Comisión, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente



**DOCTORA DOLORES MINO LEÓN**  
Secretario Ejecutivo  
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Doctor Hermilo de la Cruz Yáñez, Director de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI
- Doctor Miguel Ángel Villasis Keever, Director de Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

DML:brs

**IMSS**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

18 OCT 2007

4° piso bloque "E" de la Unidad de Congressos Av. Cuauhtémoc 530 Col. Doctores México 06720

## ANEXO 2. APROBACIÓN DE FINANCIAMIENTO POR EL FONDO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, IMSS.

Carta Compromiso

Página 1 de 1



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

### CARTA COMPROMISO

**Dr. Cesar Alberto Cruz Santiago**  
Coordinador de Investigación en Salud  
Presente

**Proyecto:** Correlación de la expresión del gen **BIK** con la expresión de los genes **HMAM** y **CK-19** en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama

Por este conducto, me comprometo a ejercer los recursos económicos asignados para el desarrollo del proyecto de investigación en referencia, con apego a la normatividad vigente y de acuerdo con el cronograma de trabajo de la propuesta original y el desglose presupuestal autorizado. Asimismo, me comprometo a entregar a la Coordinación de Investigación en Salud, los informes técnicos y financieros semestrales del proyecto de investigación hasta su terminación.

**Atentamente**

**Dr(a): Diego Julio Arenas Aranda**

**Adscripción:** Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Siglo XXI

  
Firma

**IMSS**

REGULADO Y SUBORDINADO SOCIAL

### ANEXO 3. ESTADIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA.

#### Tumor primario

Las definiciones para clasificar el tumor primario (T) son las mismas para la clasificación clínica y patológica. Si las mediciones son hechas por exploración física, el médico debe usar los estadios mayores (T1, T2 o T3). Si se realizan otras mediciones tales como la mamografía o estudio histopatológico puede usarse los subgrupos de los estadios mayores (26) como se observa en la tabla 11.

**Tabla 11.** Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN de acuerdo al tumor.

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

Tomado de: Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.

La clasificación de los ganglios linfáticos regionales mediante la evaluación clínica se observa en la tabla 12.

**Tabla 12.** Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN de acuerdo la evaluación de ganglios linfáticos regionales.

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

Tomado de: Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.

La evaluación puede realizarse mediante el estudio histopatológico (pN) o por biología molecular como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN, evaluación por estudio histopatológico y por biología molecular.

pNX	No pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
pN0	No hay metástasis a ganglios linfáticos histológicamente. Pruebas adicionales (moleculares o inmunohistoquímicas negativas).
pN0(i-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica negativa.
pN0 (i+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica positiva.
pN0 (mol-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. RT-PCR negativa.
pN0 (mol+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. RT-PCR positiva.

pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y/o ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela pero no identificable clínicamente.
pN1mic	Micrometástasis (mayor de 0.2 mm y menor de 2.0 mm)
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamaros internos
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o clínicamente con ganglios mamaros internos
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares
pN2b	Metástasis en apariencia clínica en ganglios mamaros internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares o metástasis a ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis clínicamente aparentes en ganglios mamaros internos ipsilaterales en presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por un ganglio centinela sin afección clínica aparente.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales

Tomado de: Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.

El apartado M se refiere a la presencia de metástasis a distancia como se observa en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN, clasificación de acuerdo a la presencia de metástasis.

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

Tomado de: Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.

La clasificación por estadios quedaría como se puede ver en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación TMN.

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

Tomado de: Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.



## **ANEXO 4. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama

#### **Información sobre el estudio.**

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación. El estudio de investigación involucra a personas afectadas con Cáncer de mama en diferentes estadios. La gran mayoría de mujeres afectadas presentan una masa mamaria o anomalía en estudio mamográfico de rutina como la única manifestación clínica de la enfermedad, lo que lleva a que aproximadamente 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer mamario lleguen a encontrarse ya con enfermedad metastásica (diseminación de células tumorales a distancia).

Por este conducto se le solicita su consentimiento informado para realizar la búsqueda de expresión de cinco genes denominados BIK, CK-19, hMAM y HPRT en muestras de tejido tumoral mamario y sangre periférica que permitirá conocer si el gen BIK puede funcionar como marcador de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en diferentes etapas de su enfermedad.

#### **Procedimiento.**

Se tomarán 6 mL de sangre periférica del paciente siempre y cuando reúnan los criterios de inclusión establecidos previamente y solo si desean participar de manera libre en este protocolo de investigación.

#### **Riesgos.**

Son exclusivos de la punción venosa y se refiere a la necesidad de punción en más de una ocasión en casos excepcionales. También puede desarrollarse hematoma, mismo que se resuelve espontáneamente. En cuanto a la toma de la biopsia no tiene mayor implicación que la informada por su médico oncólogo.

#### **Beneficios.**

El estudio en búsqueda de la expresión del gen BIK en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama podría constituir en el futuro una herramienta para identificar células tumorales mamarias ocultas en pacientes con cáncer de mama.



**Confidencialidad.**

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito.

**Participación / suspensión.**

La participación de usted en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de decidir no participar en el mismo al no autorizar la toma de muestra sanguínea o el análisis molecular de la muestra de tejido tumoral obtenido en la biopsia. El rehusarse a participar en este proyecto de investigación no afectará su atención médica.

**Consentimiento.**

La Dra. Eunice López Muñoz, investigador asociado al proyecto y el Dr. Diego Julio Arenas Aranda, investigador responsable del proyecto se han encargado de explicarle los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que éste implica. Usted ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tiene alguna duda deberá comunicarse con los responsables del estudio al teléfono 56 27 69 41 o acudir personalmente a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS.

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

## REFERENCIAS

1. Marie KF, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Gómez DH: **México: Numeralia de cáncer de mama. Fundación Mexicana para la Salud , Instituto Carso y Competitividad y salud.** Online: [http://www.salud.carso.org/docum/hoja\\_%20datos\\_cama.pdf](http://www.salud.carso.org/docum/hoja_%20datos_cama.pdf). 11/03/08.
2. **Certificados de defunción. Sistema de mortalidad y base de mortalidad.** INEGI. 2004.
3. **Boletín Estadístico Anual de Mortalidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Mortalidad General por Causas agrupadas según magnitud.** 2004.
4. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC: **Early breast cancer.** *Lancet* 2009, **373**: 1463-1479.
5. Broet P, de la RA, Scholl SM, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC *et al.*: **Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters.** *J Clin Oncol* 1995, **13**: 1578-1583.
6. Berry DA, Parmigiani G, Sanchez J, Schildkraut J, Winer E: **Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history.** *J Natl Cancer Inst* 1997, **89**: 227-238.
7. Welch PL, King MC: **BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**: 705-713.
8. Folias A, Matkovic M, Bruun D, Reid S, Hejna J, Grompe M *et al.*: **BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**: 2591-2597.
9. Witt E, Ashworth A: **Biomedicine. D-Day for BRCA2.** *Science* 2002, **297**: 534.
10. Bieche I, Lidereau R: **Genetic alterations in breast cancer.** *Genes Chromosomes Cancer* 1995, **14**: 227-251.
11. **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. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** *Lancet* 1996, **347**: 1713-1727.
12. Vogelstein B, Kinzler K: **The Genetic Basis of Human Cancer.** Mc Graw Hill. USA.1998, 537-550.
13. Humphrey LL, Helfand M, Chan BK, Woolf SH: **Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force.** *Ann Intern Med* 2002, **137**: 347-360.
14. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ: **American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003.** *CA Cancer J Clin* 2003, **53**: 27-43.
15. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC: **Early breast cancer.** *Lancet* 2009, **373**: 1463-1479.
16. Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF: **Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes.** *Breast J* 2008, **14**: 3-13.

17. Silva E, Gatalica Z, Snyder C, Vranic S, Lynch JF, Lynch HT: **Hereditary breast cancer: part II. Management of hereditary breast cancer: implications of molecular genetics and pathology.** *Breast J* 2008, **14**: 14-24.
18. Nystrom L, Andersson I, Bjurstam N, Frisell J, Nordenskjold B, Rutqvist LE: **Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials.** *Lancet* 2002, **359**: 909-919.
19. Olsen O, Gotzsche PC: **Cochrane review on screening for breast cancer with mammography.** *Lancet* 2001, **358**: 1340-1342.
20. Brem RF, Behrndt VS, Sanow L, Gatewood OM: **Atypical ductal hyperplasia: histologic underestimation of carcinoma in tissue harvested from impalpable breast lesions using 11-gauge stereotactically guided directional vacuum-assisted biopsy.** *AJR Am J Roentgenol* 1999, **172**: 1405-1407.
21. Baker JA, Soo MS: **Breast US: assessment of technical quality and image interpretation.** *Radiology* 2002, **223**: 229-238.
22. Olson JA, Jr., Morris EA, Van Zee KJ, Linehan DC, Borgen PI: **Magnetic resonance imaging facilitates breast conservation for occult breast cancer.** *Ann Surg Oncol* 2000, **7**: 411-415.
23. van der Hoeven JJ, Hoekstra OS, Comans EF, Pijpers R, Boom RP, van Geldere D, Meijer S, Lammertsma AA, Teule GJ: **Determinants of diagnostic performance of [F-18]fluorodeoxyglucose positron emission tomography for axillary staging in breast cancer.** *Ann Surg* 2002, **236**: 619-624.
24. Shen KW, Wu J, Lu JS, Han QX, Shen ZZ, Nguyen M, Shao ZM, Barsky SH: **Fiberoptic ductoscopy for patients with nipple discharge.** *Cancer* 2000, **89**: 1512-1519.
25. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ: **Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies: to excise or not to excise?** *Am J Surg Pathol* 2002, **26**: 1095-1110.
26. AJCC. **Cancer Staging Manual.** 6<sup>th</sup> edition. Springer. USA. 2002.
27. Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH: **The process for continuous improvement of the TNM classification.** *Cancer* 2004, **100**: 1-5.
28. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI *et al.*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 3628-3636.
29. Fisher ER, Dignam J, Tan-Chiu E, Costantino J, Fisher B, Paik S *et al.*: **Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eight-year update of Protocol B-17: intraductal carcinoma.** *Cancer* 1999, **86**: 429-438.
30. Lawrence M. **Current medical diagnosis and treatment.** Lange. USA. 2004, 680-681.
31. Raabe NK, Hagen S, Haug E, Fossaa SD: **Hormone receptor measurements and survival in 1335 consecutive patients with primary invasive breast carcinoma.** *Int J Oncol* 1998, **12**: 1091-1096.

32. Carmeci C, deConinck EC, Lawton T, Bloch DA, Weigel RJ: **Analysis of estrogen receptor messenger RNA in breast carcinomas from archival specimens is predictive of tumor biology.** *Am J Pathol* 1997, **150**: 1563-1570.
33. Leary A, Dowsett M: **Combination therapy with aromatase inhibitors: the next era of breast cancer treatment?** *Br J Cancer* 2006, **95**: 661-666.
34. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM: **Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens.** *Cancer Res* 2003, **63**: 8037-8050.
35. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC: **Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance.** *Pharmacol Rev* 2001, **53**: 25-71.
36. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A: **Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses.** *Cancer* 2003, **98**: 1802-1810.
37. Nabholz JM, Mouret-Reynier MA, Durando X, Van P, I, Al Sukhun S, Ferriere JP, Chollet P: **Comparative review of anastrozole, letrozole and exemestane in the management of early breast cancer.** *Expert Opin Pharmacother* 2009, **10**: 1435-1447.
38. Deeks ED, Scott LJ: **Exemestane: a review of its use in postmenopausal women with breast cancer.** *Drugs* 2009, **69**: 889-918.
39. Lee WL, Cheng MH, Chao HT, Wang PH: **The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene.** *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008, **47**: 24-31.
40. Afonso N: **Women at high risk for breast cancer--what the primary care provider needs to know.** *J Am Board Fam Med* 2009, **22**: 43-50.
41. Teran D, Teppa G. **Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología.** *Ginecol Obstet Méx* 2005, **73**: 424-435.
42. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S *et al.*: **HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival.** *Mol Diagn* 2000, **5**: 199-207.
43. Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ: **Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases.** *Am J Clin Pathol* 2005, **123**: 16-20.
44. Key M: **Immunohistochemical Staining Methods.** 4<sup>th</sup> edition. DAKO. USA. 2006, 1-172.

45. Abrams JS: **Adjuvant therapy for breast cancer--results from the USA consensus conference.** *Breast Cancer* 2001, **8**: 298-304.
46. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER *et al.*: **Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**: 1233-1241.
47. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N: **Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation.** *N Engl J Med* 2002, **347**: 567-575.
48. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ: **Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer.** *J Clin Oncol* 2001, **19**: 3817-3827.
49. Nguyen DX, Bos PD, Massague J: **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**: 274-284.
50. Rouzier R, Extra JM, Klijanienko J, Falcou MC, Asselain B, Vincent-Salomon A *et al.*: **Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes.** *J Clin Oncol* 2002, **20**: 1304-1310.
51. Noriega RM, Langley ME: **Receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario.** *Rev Inst Nal Cancerol.* 2008, **3**: 29-40.
52. Shi H, Shigeta H, Yang N, Fu K, O'Brian G, Teng CT: **Human estrogen receptor-like 1 (ESRL1) gene: genomic organization, chromosomal localization, and promoter characterization.** *Genomics* 1997, **44**: 52-60.
53. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER: **Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 50768-50775.
54. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P: **Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription.** *Curr Genomics* 2006, **7**: 497-508.
55. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G *et al.*: **Mechanisms of estrogen action.** *Physiol Rev* 2001, **81**: 1535-1565.
56. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta: an overview and update.** *Nucl Recept Signal* 2008, **6**: e003.
57. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C: **Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000.** *Ann Oncol* 2005, **16**: 489-511.

58. Teppa G, Teran D. **Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos.** *Ginecol Obstet Mex* 2005, **73**:436-442.
59. Tan H, Zhong Y, Pan Z: **Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines.** *BMC Cancer* 2009, **9**: 31.
60. Levin ER: **Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**: 1951-1959.
61. Russo J, Russo IH: **Molecular Basis of Breast Cancer.** Springer. USA. 2004,49-81.
62. Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC: **Anatomy of the estrogen response element.** *Trends Endocrinol Metab* 2004, **15**: 73-78.
63. Deroo BJ, Korach KS: **Estrogen receptors and human disease.** *J Clin Invest* 2006, **116**: 561-570.
64. Tena SME, Herrera SD, Hernández LJ. Huicochea MJC. Rodríguez A: **Síndrome de Li Fraumeni cáncer familiar comunicación de un caso y revisión de la literatura.** *Acta Ortopédica Mexicana* 2007, **2**:99-104.
65. Royds JA, Iacopetta B: **p53 and disease: when the guardian angel fails.** *Cell Death Differ* 2006, **13**: 1017-1026.
  
66. Mai PL, Chatterjee N, Hartge P, Tucker M, Brody L, Struewing JP *et al.*: **Potential excess mortality in BRCA1/2 mutation carriers beyond breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancers, and melanoma.** *PLoS One* 2009, **4**: e4812.
  
67. Wiseman BS, Werb Z: **Stromal effects on mammary gland development and breast cancer.** *Science* 2002, **296**: 1046-1049.
68. Hahn WC, Weinberg RA: **Modelling the molecular circuitry of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 331-341.
69. Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D: **Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22Q in human sporadic breast carcinomas.** *Int J Cancer* 1998, **75**: 181-186.
70. Bertram JS: **The molecular biology of cancer.** *Mol Aspects Med* 2000, **21**: 167-223.
71. Malumbres M, Barbacid M: **To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**: 222-231.
  
72. Suen DF, Norris KL, Youle RJ: **Mitochondrial dynamics and apoptosis.** *Genes Dev* 2008, **22**: 1577-1590.
73. Mathon NF, Lloyd AC: **Cell senescence and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**: 203-213.
  
74. Rathmell JC, Thompson CB: **Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease.** *Cell* 2002, **109 Suppl**: S97-107.
75. Wu M. **Apoptosis Molecular Mechanisms.** *Enciclopedia of Life Sciences*.2001. online: [www.els.net](http://www.els.net).

76. Holmgreen SP, Huang DC, Adams JM, Cory S: **Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members.** *Cell Death Differ* 1999, **6**: 525-532.
77. Shimizu S, Tsujimoto Y: **Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:577-582.
78. Tsujimoto Y: **Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria.** *J Cell Physiol* 2003, **195**:158-167.
79. Brunelle JK, Letai A: **Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family.** *J Cell Sci* 2009, **122** (Pt 4):437-441.
80. Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Custeau D, Chittenden T *et al.*: **The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain.** *Mol Cancer Ther* 2001, **1**: 95-102.
81. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ *et al.*: **Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins.** *Oncogene* 1995, **11**: 1921-1928.
82. Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM: **Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003, **38**: 91-96.
83. Mathai JP, Germain M, Shore GC: **BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death.** *J Biol Chem* 2005, **280**: 23829-23836.
84. Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Starck L, Radetzki S, Dorken B *et al.*: **Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway.** *EMBO J* 2003, **22**: 3580-3590.
85. Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J: **Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik.** *Oncogene* 2005, **24**: 7369-7380.
86. Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD *et al.*: **High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors.** *Cancer Res* 2005, **65**: 4088-4096.
87. Bandres E, Catalan V, Sola I, Honorato B, Cubedo E, Cordeu L *et al.*: **Dysregulation of apoptosis is a major mechanism in the lymph node involvement in colorectal carcinoma.** *Oncol Rep* 2004, **12**: 287-292.
88. Pompeia C, Hodge DR, Plass C, Wu YZ, Marquez VE, Kelley JA *et al.*: **Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in**

- the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2004, **64**: 3465-3473.
89. Adams JM, Cory S: **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** *Science* 1998, **281**: 1322-1326.
  90. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC: **Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis.** *EMBO J* 2005, **24**: 1546-1556.
  91. Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS: **The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim.** *Mol Cancer Ther* 2005, **4**: 443-449.
  92. Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F *et al.*: **Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors.** *Oncogene* 2005, **24**: 4993-4999.
  93. Zhu H, Guo W, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ *et al.*: **Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation.** *Cancer Biol Ther* 2005, **4**: 781-786.
  94. Zou Y, Peng H, Zhou B, Wen Y, Wang SC, Tsai EM *et al.*: **Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene bik.** *Cancer Res* 2002, **62**: 8-12.
  95. Li Z, Ding Q, Li Y, Miller SA, Abbruzzese JL, Hung MC: **Suppression of pancreatic tumor progression by systemic delivery of a pancreatic-cancer-specific promoter driven Bik mutant.** *Cancer Lett* 2006, **236**: 58-63.
  96. Lo HW, Day CP, Hung MC: **Cancer-specific gene therapy.** *Adv Genet* 2005, **54**: 235-255.
  97. Day CP, Rau KM, Qiu L, Liu CW, Kuo HP, Xie X *et al.*: **Mutant Bik expression mediated by the enhanced minimal topoisomerase IIalpha promoter selectively suppressed breast tumors in an animal model.** *Cancer Gene Ther* 2006, **13**: 706-719.
  98. Coultas L, Bouillet P, Loveland KL, Meachem S, Perlman H, Adams JM *et al.*: **Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis.** *EMBO J* 2005, **24**: 3963-3973.
  99. Willis SN, Adams JM: **Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**: 617-625.
  100. Coultas L, Bouillet P, Stanley EG, Brodnicki TC, Adams JM, Strasser A: **Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Bik/Nbk is expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**: 1570-1581.
  101. Verma S, Budarf ML, Emanuel BS, Chinnadurai G: **Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences.** *Gene* 2000, **254**: 157-162.
  102. Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dorken B *et al.*: **Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-**



**induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice.** *Blood* 1999, **94**: 1100-1107.

103. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S *et al.*: **Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma.** *Cell Death Differ* 2006, **13**: 619-627.
104. Hur J, Chesnes J, Coser KR, Lee RS, Geck P, Isselbacher KJ *et al.*: **The Bik BH3-only protein is induced in estrogen-starved and antiestrogen-exposed breast cancer cells and provokes apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 2351-2356.
105. Bertucci F, Birnbaum D: **Reasons for breast cancer heterogeneity.** *J Biol* 2008, **7**: 6.
106. Sommer S, Fuqua SA: **Estrogen receptor and breast cancer.** *Semin Cancer Biol* 2001, **11**: 339-352.
107. Wang TT, Phang JM: **Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7.** *Cancer Res* 1995, **55**: 2487-2489
108. Leung LK, Do L, Wang TT: **Regulation of death promoter Bak expression by cell density and 17 beta-estradiol in MCF-7 cells.** *Cancer Lett* 1998, **124**: 47-52
109. Fu Y, Li J, Lee AS: **GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis.** *Cancer Res* 2007, **67**: 3734-3740.

**Este trabajo fue elaborado con los siguientes recursos humanos, materiales y financieros:**

Muestras de tejido tumoral mamario de pacientes con cáncer de mama en diferentes estadios clínicos que cumplieron con los criterios de inclusión obtenidos del Hospital de Oncología del CMN SXXI, IMSS.

La toma de muestras de biopsia fue efectuada por el Dr. Gelazio Zarco Espinosa, Dr. Mauricio Enrique Gómez del Toro y Dra. Eunice López Muñoz.

La recolección de muestras, su procesamiento y las técnicas de biología molecular de expresión del gen BIK se realizaron por Dra. Eunice López Muñoz y RGM Adelina Hernández Zarco.

La revisión de expedientes y/o estudio histopatológico se realizó por RGM Adelina Hernández Zarco.

Los procedimientos fueron supervisados por el Tutor principal del proyecto Dra. Eunice López Muñoz.

El análisis estadístico se efectuó por la Dra. Eunice López Muñoz y RGM Adelina Hernández Zarco.

Este proyecto se llevo a cabo con los recursos financieros otorgados por el FIS al ser parte del proyecto de investigación titulado "Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama", en el que participan Dr. Fabio Salamanca Gómez, Dr. Diego Julio Arenas Aranda y Dra. Eunice López Muñoz.

La determinación de estrógenos se efectuó como parte del procedimiento de atención de pacientes con cáncer de mama, realizándose la técnica de inmunohistoquímica por los histotecnólogos Irma Hernández Calderas y Oscar Martínez Quirarte con la supervisión de la Dra. Ivone Cuadra Ramírez y la Dra. Isabel Alvarado Cabrero, Jefe de servicio de Patología del Hospital de Oncología CMN SXXI, IMSS. La Dra. Alvarado, además autorizó consultar los resultados de inmunohistoquímica.