



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**“Estudio de Proteómica en tumores mamarios etapas II y III
en mujeres de la población mexicana”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BEATRIZ CASTREJÓN GALLEGOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez

**COMITÉ TUTOR: Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá**

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CASTREJÓN GALLEGOS BEATRIZ** con número de cuenta **99066718** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE PROTEÓMICA EN TUMORES MAMARIOS ETAPAS II Y III EN MUJERES DE LA POBLACIÓN MEXICANA."**, realizada bajo la dirección de la : **DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ**

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Secretario: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de febrero de 2011


DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo que me otorgó para poder realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico recibido para realizar este proyecto.

Agradezco al Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, Coordinador de Investigación en Salud, IMSS, por su dirección y apoyo en la elaboración de la tesis. Le agradezco su disposición y tiempo para enseñarme sus valiosos conocimientos que me guiaron en mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco al Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara por su absoluta disposición para la realización de este proyecto, por haberme abierto las puertas de su Laboratorio, por brindarme su confianza, conocimientos y experiencia sin igual a lo largo de este período tan importante. Es admirable el tiempo que invirtió para obtener los mejores resultados en este proyecto, mil gracias !!!.

Agradezco al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá por su apoyo y ayuda en mi formación profesional y personal.

Agradezco al Dr. Diego Julio Arenas Aranda por su apoyo incondicional, paciencia, tiempo y dedicación en la realización de este proyecto de investigación. Gracias por brindarme sus consejos siempre positivos para enfrentar los momentos difíciles.

Agradezco a la Ing. Magdalena Hernández Ortiz Tec. Tit. A y al Técnico de Proyecto Ángel Gabriel Martínez (Laboratorio de Proteómica, Centro de Ciencias Genómicas UNAM) por brindarme todo su apoyo, conocimientos y experiencia para poder llevar a cabo cada uno de los experimentos. Por su disciplina, capacidad y su paciencia para enseñarme.

Al Centro de Ciencias Genómicas, UNAM y al Instituto Mexicano del Seguro Social por permitirme usar las instalaciones, equipo y material necesarios para realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Gelasio Zarco Espinosa y a la Dra. Vergara por brindarnos el apoyo y colaboración para la obtención de las muestras necesarias para este estudio.

Agradezco a los miembros del jurado:

Dra. Yolanda López Vidal.

Dra. Marcela Lizano Soberón.

Por su valiosa contribución disponibilidad y colaboración en la elaboración de este trabajo de investigación.

Agradezco además a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

DEDICATORIAS

A mis queridos padres que siempre me han brindado su cariño y apoyo incondicional, por haberme cuidado y enseñado los mejores valores de la vida, gracias por impulsarme para mejorar día a día, como persona y profesionalmente, ustedes han sido mi soporte y guía para alcanzar todas mis metas. Los amo y me siento orgullosa de que sean mis padres.

A mi hermana Abigail que siempre ha estado a mi lado como compañera y amiga incondicional, que es ejemplo de perseverancia, dedicación, éxito y alegría. Te amo hermanita.

A mi hermano Alan que es un ejemplo de fortaleza, lucha e inteligencia, gracias por enseñarme tanto, te amo y admiro hermano.

A mi David por amarme y cuidarme sobre todas las cosas, por hacerme sonreír todos los días desde que te conocí, gracias por brindarme tu cariño y amistad, por respetar mis decisiones, por escucharme y por sentirte orgulloso de mí. Gracias por compartir tu vida junto a mí, por enseñarme día a día a formar nuestro hogar y por cuidar a nuestra familia. Te amo y amaré por siempre; me haces muy feliz.

A mi abuela Mari por ser un ejemplo de trabajo y dedicación a su familia, siempre he disfrutado de tu compañía y aunque la distancia nos separa siempre te recuerdo con gran alegría, gracias por brindarme tan bellos momentos desde mi niñez.

A mi mejor amiga Ruth que me ha ayudado a superar tantas adversidades durante este período, por acompañarme en todo momento y aconsejarme correctamente, porque te considero mi hermana y por brindarme tu valiosa amistad, por tus ocurrencias que me han hecho sonreír en los peores momentos. Gracias por todo amiga y te quiero mucho.

A mi querida amiga la Dra. Maria Guadalupe Quiñonez la admiro por ser una gran dama, por ser tan bondadosa e inteligente, la quiero y admiro.

A Miguel Ángel un gran amigo y un futuro gran investigador, recuerda que tienes todo para triunfar. Los queremos mucho y son nuestros mejores amigos.

A mi gran amiga Mónica por transmitirme su serenidad y paciencia, te aprecio mucho amiga. Gracias por tu alegría y apoyo.

Dedico esta tesis especialmente a la memoria del Dr. Javier Cabiedes Contreras, considero que es de las mejores personas que he conocido en toda mi vida, no sólo por sus logros de excelencia tanto académicos como profesionales sino por sus distinguidas cualidades como humano, algunas de ellas fueron la humildad, compasión, dedicación, honestidad, compañerismo, alegría y el sarcasmo tan característico y que al menos a mi me causaba sonreír todos los días. Otra gran característica esencial en él era su innegable ecuanimidad con todos los que le conocían, y por estas razones él era y seguirá siendo un ejemplo a seguir. Gracias a su disciplina y empeño pude entender el valor de mi verdadera vocación. Siempre lo recordaré y extrañaré.

Al grupo de Investigación del Laboratorio de Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán: Carlos, Diego, Eli, Araceli y Tere; por compartir tantas enseñanzas y por brindarme su amistad. Ustedes no solo me mostraron como se trabaja en un verdadero laboratorio “certificado” también me enseñaron el valor del trabajo diario, que en realidad junto a ustedes era formidablemente agradable. Gracias.

Al gran equipo de investigación del Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas: Dr. Sergio M. Encarnación Guevara, Ing. Magdalena Hernández Ortiz y al Téc. de Proyecto Ángel Gabriel Martínez, le agradezco por brindarme su apoyo y tiempo. Los admiro y respeto por su dedicación y compromiso con este proyecto.

A Maria de los Ángeles, Maria Fernanda, Jesus, David y el querido abuelo el Señor Eulalio, por brindarnos su hogar y apoyarnos en todo momento. Por concedernos su cariño, comprensión y sus consejos tan valiosos. Los quiero mucho.

A mis amigos y familia: Rosa Angélica, Cuauhtémoc, Iván y Carlos ustedes me han enseñado mucho, los admiro por ser tan unidos y comprometidos como familia. Recuerden que los quiero mucho.

A Rosa María y Arturo que me brindaron su cariño y hogar, me siento muy afortunada por conocerlos y recuerden que siempre están presentes en mi corazón. Ustedes son ejemplo de trabajo, empeño, inteligencia y valentía.

A mi amiga Ana Lilia que me has acompañado toda mi carrera brindándome tu amistad, te considero una de las mejores personas que conozco, gracias por todo.

A mis amigas de la UMIGH: Ana Claudia y Martha, por compartir sus conocimientos conmigo, por sus consejos y amistad, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Cáncer	5
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 Definición.....	5
1.3 Características de las neoplasias malignas	6
1.4 Bases moleculares del cáncer.....	9
2. Cáncer de mama	10
2.1 Definición y Epidemiología.....	10
2.2 Anatomía.....	13
2.3 Embriología y fisiología.....	21
2.4 Factores de riesgo y predicción.....	24
2.5 Detección temprana.....	29
2.6 Estadificación.....	32
2.7 Tipos histológicos.....	36
2.8 Tratamiento.....	42
3. Genómica	50
3.1 Genómica y cáncer.....	53
4. Proteoma	55
4.1 Proteínas.....	56
4.2 Proteómica.....	60
4.3 Genómica y Proteómica en Cáncer de mama.....	66
5. Justificación	79

6. Hipótesis	80
7. Objetivos	81
8.1 Objetivo general.....	81
8.2 Objetivos particulares.....	81
8. Metodología	82
8.1 Selección de los pacientes.....	82
8.2 Obtención de las muestras.....	82
8.3 Extracción y solubilización de proteínas totales.....	83
8.4 Cuantificación de proteínas.....	84
8.5 Gel de acrilamida- bisacrilamida SDS-PAGE al 12 %.....	86
8.6 Tinción de los geles (SDS-PAGE) con azul de Coomassie.....	88
8.7 Electroforesis bidimensional.....	89
8.8 Tinción con plata.....	94
8.9 Escaneo de los geles en 2-D y análisis de las imágenes.....	95
9. Resultados	96
9.1 Recolección y almacenamiento de muestras.....	96
9.2 Cuantificación de proteínas. Método de Bradford.....	97
9.3 Geles de acrilamida-bisacrilamida SDS-PAGE al 12%.....	98
9.4 Electroforesis bidimensional.....	100
9.5 Análisis de las imágenes (geles en 2-D).....	118
10. Discusión	125
11. Conclusiones	127
12. Perspectivas	129
13. Bibliografía	129
14. Mesografía	135

ABREVIATURAS

ACOH: Ácido acético.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AgNO₃: Nitrato de plata.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ASB: Albúmina Sérica Bovina.

Bis-acrilamida: N¹N¹-metilen-acrilamida- bisacrilamida.

BRCA 1: Cáncer de mama 1 (“Breast Cancer 1”).

BRCA2: Cáncer de mama 2 (“Breast Cancer 2”).

°C: Grados centígrados.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (“complementary Deoxyribonucleic Acid”).

C₆FeK₃N₆: Hexacianoferrato III.

CGH: Hibridación genómica comparada (“Comparative Genomic Hybridization”).

CH₃(CO): Acetona.

CH₃COOH: Ácido acético.

C₂H₂O₄: Ácido oxálico.

CH₃OH: Metanol.

C₆H₅OH: Fenol.

CH₃COONH₄: Acetato de amonio.

Cl₃Fe: Cloruro férrico.

CMNSXXI: Centro Médico Nacional Siglo XXI.

DTT: 1,4-Dimercapto DL-Trio - DL-1,4-Ditio-Treitol

EtOH: Alcohol etílico absoluto anhidro.

FSH: Hormona foliculoestimulante (“Follicle Stimulating Hormone”).

g: Gramo

HCOH: Formaldehido.

H₂O: Agua

H₂O_d: Agua destilada

H₂O mili Q: H₂O bidestilada 18.3 ohm

H₃PO₄: Ácido fosfórico.

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

L: Litro

LH: Hormona luteinizante (“Luteinizing Hormone”).

M: Molaridad o concentración molar.

MeOH: Metanol.

mL: Mililitro.

μL: Microgramo.

N: Normalidad.

Na₂CO₃: Carbonato de sodio.

NaOH: Hidróxido de sodio.

Na₂S₂O₃. SH₂O: Tiosulfato de sodio.

nm: Nanómetro

pH: Del latín pondus Hydrogenii “potencia de Hidrógeno”.

PBS: Tampón fosfato salino (“Phosphate Buffer Saline”).

PSA: Persulfato de amonio.

RHNM. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas.

rpm: Revoluciones por minuto.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SNP: Polimorfismo de una base (“Single Nucleotide Polymorphism”)

SUIVE. Sistema único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

TA: Temperatura ambiente.

TEMED: 2-butanol, N, N, N¹ N¹ tetrametilen -diamina.

TMA: Microarreglo de tejido (“Tissue MicroArray”).

Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano- ácido clorhídrico.

V: Volts.

RESUMEN

Las enfermedades oncológicas son uno de los principales problemas de Salud Pública que enfrentamos actualmente. Dentro de éstas el cáncer de mama es actualmente la neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial, constituye un grave problema de salud global por su morbilidad y mortalidad. El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se ha transformado en las últimas décadas, presentándose actualmente como la primera causa de mortalidad en mujeres. El cáncer de glándula mamaria es un padecimiento de origen multifactorial en el cual el 85% de los casos no hay evidencia de historia familiar, es decir son de tipo esporádico. En este padecimiento heterogéneo se desarrollan células malignas, como resultado de la acumulación de numerosas y frecuentes alteraciones moleculares que causan proliferación celular con incremento invasivo, un fenotipo resistente e inestabilidad genética. Esto ha motivado una infinidad de estudios para tratar de diagnosticar oportunamente, identificar características genético – moleculares que permitan determinar el pronóstico y tratamiento más adecuado de acuerdo a las diferentes variedades histológicas que existen en esta neoplasia. Entre estos estudios encontramos a los basados en la Proteómica que es una disciplina fundamental en la era post-genómica y trata de describir el grupo de proteínas que dan a las células su estructura y función. Una de las razones por la cual la Proteómica ha despertado enormes expectativas en la investigación Biomédica es por su potencial en la identificación de Biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar y pronosticar enfermedades, así como la definición de nuevas dianas terapéuticas. Es por esto que en este trabajo se presentan los perfiles de expresión proteicos de tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado, de 9 mujeres mexicanas con Cáncer de Mama en estadios clínicos II y III mediante el uso de electroforesis bidimensional a partir de extractos totales de proteínas. Para alcanzar dichos objetivos se estandarizaron metodologías de extracción y solubilización adecuadas para este tipo de tejido. Posteriormente la separación de las proteínas se realizó con electroforesis bidimensional. Se obtuvieron imágenes del patrón de expresión de las proteínas de tejido mamario neoplásico y su control (tejido mamario no afectado de la misma paciente) que revelaron que si existen diferencias en la expresión de los perfiles proteicos provenientes de tejidos tumorales y sus tejidos adyacentes.

Por cada comparación que realizamos, tanto el análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico aportaron datos importantes que servirán como base para tener un mapa de las proteínas que están expresadas diferencialmente, ya sea expresadas en un solo grupo, o bien presentes en todos, en este caso sobre-expresadas o sub-expresadas para la identificación posterior de las proteínas involucradas en el desarrollo de este tipo de neoplasia.

ABSTRACT

Oncologic diseases are one of the main problems currently faced in Public Health. Among these, breast cancer is now a days the most frequent neoplasia in women worldwide, constituting a serious global health problem due to its morbidity and mortality. The epidemiologic panorama of this pathology in the Mexican populations has been transformed in the last decades, being currently presented as the first cause of death in women. Breast cancer is a disease of multifactorial origin, in which 85% of the cases have no familial history, meaning it is sporadic. Malignant cells develop in this heterogeneous disease as the result of an accumulation of many and frequent molecular alterations that cause cell proliferation with an invasive increase, a resistant phenotype, and genetic instability. This has lead to many studies to aid a prompt diagnosis, to identify the molecular-genetic characteristics that allow determining the prognosis and best treatment according to the different histological varieties that exist in this neoplasia. Among these studies we find those based in Proteomics, which is a fundamental discipline in the post-genomic era and tries to describe the group of proteins that give to cells their structure and function. One of the reasons why Proteomics has originated huge expectation in Biomedic research is due to its potential in the identification of specific Biomarkers that allow diagnosing, classifying, and making the prognosis of diseases, as well as the definition of new therapeutic targets. Due to this, the profiles of the protein expression of the neoplastic breast tissues and non-affected breast tissues of 9 Mexican women with breast cancer in clinical stages II and III by means of bidimensional electrophoresis from total extracts of protein are presented in this work. To reach such objectives, extraction and solubilization methodologies adequate for this type of tissue were standardized. Then, the separation of the proteins was performed by bidimensional electrophoresis. The protein expression patters of the neoplastic breast tissue and its control (non-affected breast tissue from the same patient) were obtained, revealing that there exist differences in the expression of the protein profiles from tissues with tumors and adjacent tissues.

Each comparison that we performed in the qualitative, quantitative, and statistical analyses provided important data that will serve as basis for a map of the proteins that are differentially expressed, either expressed in one group or present in all, in this case over-expressed or under-expressed to later identify the proteins involved in the development of this type of neoplasia.

INTRODUCCIÓN.

1. Cáncer.

1.1 Epidemiología.

El cáncer se considera como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y aunque se han logrado algunos progresos, el problema sigue siendo abrumador. La incidencia del cáncer varía según la edad, la raza, los factores geográficos y las características genéticas. Esta patología es producida por la acumulación de numerosas alteraciones moleculares, que causan la proliferación celular, incremento invasivo, un fenotipo resistente y una inestabilidad genética en la célula [1]. En el 2006, el cáncer representó la tercera causa de muerte en México con 63 888 defunciones y la Organización Mundial de la Salud, estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015 [2]. En Estados Unidos se estima que un total de 1, 529, 560 nuevos casos y 569, 490 muertes por cáncer se produzcan en este país en el año 2010 [3].

1.2 Definición.

El oncólogo Sir Rupert Willis definió a la neoplasia de la siguiente manera: «Una neoplasia es una masa anormal de tejido, con un crecimiento no coordinado que sobrepasa al de los tejidos normales, que conserva el mismo carácter excesivo una vez concluido el estímulo que provocó el cambio». A esta definición se puede añadir que la masa tumoral, es prácticamente autónoma y ataca al huésped en la medida en que el crecimiento del tejido neoplásico compite con los tejidos y células normales por el suministro de energía.

Neoplasia significa « nuevo crecimiento». El término *tumor* se aplicó primero a la tumefacción debida a la inflamación. Aunque también las neoplasias pueden dar lugar a tumefacción y, por falta de uso, el sentido no neoplásico de *tumor* caducó hace mucho tiempo; por tanto, ese término equivale ahora al de neoplasia.

Cáncer es la forma común de designar a todos los tumores malignos. Deriva de la palabra latina para cangrejo, *cancer*, porque el tumor «se adhiere a todo lo que agarra, con la misma obstinación que un cangrejo».

Las neoplasias benignas y malignas, tienen dos componentes básicos:

1. Las células neoplásicas proliferantes que constituyen su parénquima.
2. Su estroma de sostén, constituido por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos.

Las células parenquimatosas constituyen el borde agresivo de las neoplasias y determinan la naturaleza de éstas, el crecimiento y la evolución de las mismas dependen de su estroma.

Las neoplasias malignas de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales del embrión, se denominan carcinomas.

1.3 Características de las neoplasias malignas.

Los términos de *diferenciación y anaplasia* se aplican a las células que forman el parénquima de las neoplasias. La diferenciación indica el grado en que las células parenquimatosas se asemejan a las células normales tanto morfológica como funcionalmente.

Los tumores bien diferenciados son aquellos compuestos por células que recuerdan a las células maduras normales del tejido del que proceden. Los tumores poco diferenciados o indiferenciados están compuestos por células de aspecto primitivo, no especializado. Las neoplasias malignas varían desde bien diferenciadas a indiferenciadas, las neoplasias malignas compuestas por células totalmente indiferenciadas son anaplásicas, esto es una característica clave de la transformación maligna. Las células anaplásicas se caracterizan por presentar cambios morfológicos y funcionales, por ejemplo sus núcleos poseen pleomorfismo, esto es, variaciones en la forma y tamaño, pudiendo encontrar de esta manera células mucho más grandes que sus vecinas y de aspecto primitivo. El núcleo puede contener abundante DNA y cambio en la coloración (hipercromático), además el tamaño es desproporcionado. Las neoplasias indiferenciadas suelen presentar abundantes mitosis gracias a la gran actividad de proliferación de las células parenquimatosas, aunque esto no indica que el tejido en estudio sea necesariamente tumoral, ya que muchos tejidos no patológicos presentan una rápida velocidad de recambio y numerosas mitosis.

Otra característica citológica importante de la anaplasia es la formación de células tumorales gigantes, algunas presentan un núcleo polimorfo solitario e hiper cromático y enorme, otras pueden presentar dos o más núcleos. Además la orientación de las células anaplásicas se encuentra muy alterada perdiendo la polaridad normal. Frecuentemente el estroma vascular es escaso, por lo que muchas neoplasias anaplásicas presentan necrosis isquémicas de las zonas centrales.

La **displasia** por otra parte significa crecimiento desordenado; se encuentra sobre todo en los epitelios y se presentan cambios como la pérdida de la uniformidad de las células individuales y la pérdida de su orientación. Estas células también pueden presentar pleomorfismo y núcleos grandes e hiper cromáticos. Las mitosis también son más abundantes de lo habitual. Cuando las alteraciones displásicas son importantes y afectan a todo el grosor del epitelio, se considera que la lesión es una **neoplasia preinfiltrante** y se le da el nombre de **carcinoma in situ**, Figura 1. La displasia no necesariamente progresa a cáncer [4]. Cuanto más crezca una neoplasia y más anaplásica sea, menor probabilidad tendrán sus células de desarrollar una actividad funcional especializada.

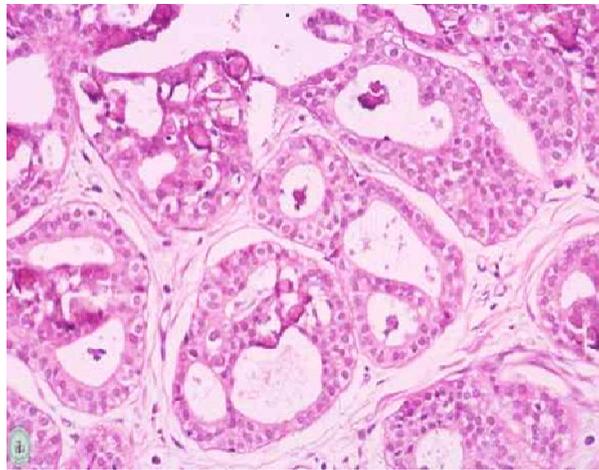


Figura 1. Carcinoma ductal in situ de mama [1]. Ductos ensanchados debido a una proliferación de células monomorfas, que presentan un patrón desordenado con pérdida de su orientación.

Velocidad de crecimiento: En general las neoplasias benignas crecen de forma lenta a lo largo de los años, mientras que la mayoría de las neoplasias malignas crecen rápidamente y acaban por diseminarse. Aunque la velocidad de crecimiento puede no permanecer constante, ya que existen diferentes factores que afectan al crecimiento por ejemplo la dependencia hormonal, la idoneidad de la irrigación sanguínea, etc. Como es el caso de el cáncer de mama que después de la menopausia, la neoplasia puede atrofiarse y ser sustituida por tejido colágeno calcificado.

Invasión local: Las neoplasias benignas crecen formando masas cohesivas y expansivas que permanecen localizadas en su lugar de origen. Ya que crecen y expanden lentamente, suelen desarrollar una cápsula fibrosa que consta de tejido conjuntivo comprimido, esta los separa del tejido donde se encuentran asentados. Esta encapsulación tiende a mantener limitadas a las neoplasias benignas y pueden ser fácilmente palpables y móviles. Las neoplasias malignas en cambio crecen por infiltración, invasión y destrucción progresivas del tejido que los rodea (membrana basal), además suelen estar mal delimitadas. La infiltración es una de las características cruciales para diferenciar a las neoplasias malignas de las benignas [4].

Metástasis: Las metástasis son implantes tumorales que no guardan continuidad con la neoplasia primaria, las metástasis definen claramente a una neoplasia como maligna. La capacidad de infiltración de los cánceres les permite penetrar en los vasos sanguíneos, linfáticos y en las cavidades orgánicas, para que de esta forma se diseminen. Las células neoplásicas pueden diseminarse a través de tres vías: 1) siembra directa de cavidades o superficies orgánicas, 2) la diseminación linfática y 3) la diseminación hematológica [4, 5, 6].

1.4 Bases moleculares del cáncer.

El cáncer se origina debido a alteraciones en el ADN que provocan una proliferación celular incontrolada y la parte primordial de la carcinogénesis yace en el daño genético no mortal, este daño genético (o mutación) puede adquirirse por la acción de agentes ambientales, como productos químicos, radiaciones, o virus, o heredarse en la línea germinal. La hipótesis genética del cáncer implica que una masa tumoral es consecuencia de la expansión clonal de una única célula progenitora que ha sufrido un daño genético.

Aunque casi todos los cánceres son genéticos, la mayoría no son hereditarios, es decir son de aparición esporádica. En un cáncer verdaderamente esporádico, todas las mutaciones responsables del fenotipo maligno se originan de forma somática. Aunque mutaciones en la línea germinal pueden predisponer a una persona al cáncer hereditario o familiar. De esta manera encontramos que la carcinogénesis es un proceso de varios pasos secuenciales que involucra a las principales dianas de las lesiones genéticas: 1) genes reguladores normales: protooncogenes (promoción del crecimiento), 2) genes de regulación de la muerte celular programada (apoptosis) y genes relacionados con la reparación del ADN. En términos de crecimiento y supervivencia las alteraciones genéticas de las células tumorales les confieren ciertas ventajas sobre las células no tumorales.

Los tumores suelen poseer clones citogenéticamente diferentes, que surgen de la transformación inicial celular a través de las alteraciones genéticas secundarias o terciarias. Esta heterogeneidad contribuye a las diferencias en el comportamiento clínico y respuesta al tratamiento entre tumores del mismo tipo histológico. Además de la clona inicial y subclones, los tumores también pueden contener células progenitoras de cáncer, lo cual constituye todo un espectro de células con diferentes alteraciones genéticas y estados de diferenciación. Estas poblaciones pueden diferir en la sensibilidad a la quimioterapia, radioterapia y otros tratamientos, haciendo más difícil el manejo clínico. Por estas razones, los pasos iniciales en el desarrollo del cáncer son de considerable importancia clínica y son una prioridad en el desarrollo del tratamiento racional del cáncer [4, 7].

La carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos a nivel fenotípico y genotípico, que se debe a la acumulación de múltiples mutaciones. Las neoplasias malignas tienen varios atributos fenotípicos, como un crecimiento excesivo, invasión local y la capacidad de formar metástasis. Durante un período de tiempo, muchos tumores se vuelven más agresivos y adquieren un potencial maligno aún mayor. Este fenómeno se conoce como progresión tumoral. A nivel molecular, la progresión tumoral y la heterogeneidad asociada se deben a múltiples mutaciones que se acumulan de forma independiente en diferentes células [8].

2. Cáncer de mama.

2.1 Definición y Epidemiología.

El cáncer de mama es una enfermedad en que se desarrollan células malignas en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas.

El cáncer de mama es considerado un desorden multifactorial causado tanto por factores genéticos como no genéticos y es el resultado de la transformación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la glándula mamaria [9]. El cáncer puede ser causado por agentes que dañan los genes involucrados en el control de la proliferación celular (proto-oncogenes), los cuales actúan en conjunto con agentes que no dañan los genes pero que potencian selectivamente el crecimiento de las células tumorales. El cáncer aparece cuando una sola célula acumula varias mutaciones, generalmente durante varios años, escapando de los procesos de control de la proliferación y apoptosis [10].

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más común en el mundo y es la primera causa de cáncer entre mujeres con una presentación de 411,093 muertes por año. Los 3 tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados entre las mujeres en el año 2010 serán el cáncer de mama, pulmón- bronquios, colon- recto, lo que representa el 52% de casos estimados de cáncer en las mujeres [3].

Del cáncer de mama se espera que represente el 28% (207.090) de todos los nuevos casos de cáncer entre las mujeres como se puede verificar en la Tabla 1.

	Casos Nuevos Estimados			Muertes Estimadas		
	Ambos sexos	Hombres	Mujeres	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
Todos los sitios.	1,509,560	789,620	739,940	469,490	299,200	270,290
Cavidad oral y faringe.	36,540	25,420	11,120	7,880	5,430	2,450
Sistema Digestivo.	274,330	148,540	125,790	139,580	79,010	60,570
Sistema Respiratorio.	240,610	130,600	110,010	161,670	89,550	72,120
Huesos y articulaciones.	2,650	1,530	1,120	1,460	830	630
Tejidos Blandos.	10,520	5,680	4,840	3,920	2,020	1,900
Piel.	74,010	42,610	31,400	11,790	7,910	3,880
Mama	209,060	1,970	207,090	40,230	390	39,840
Sistema Genital.	311,210	227,460	83,750	60,420	32,710	27,710
Sistema Urinario.	131,210	89,620	41,640	28,550	19,110	9,440
Ojo y orbita.	2,480	1,240	1,240	230	120	110
Cerebro y Sistema Nervioso.	22,020	11,980	10,040	13,140	7,420	5,720
Sistema Endocrino.	46,930	11,890	35,040	2,570	1,140	1,430
Linfoma.	74,030	40,050	33,980	21,530	11,450	10,080
Mieloma.	20,180	11,170	9,010	10,650	5,760	4,890
Leucemia	43,050	42,690	18,360	21,840	12,660	9,180
OTROS, sitios primarios inespecíficos.	30,680	15,170	15,510	44,030	23,690	20,340

Tabla 1. Muertes y casos nuevos estimados de cáncer por sexo, Estados Unidos 2010.
Modificada de Jemal et al. 2010 [3].

En nuestro país se registraron 11,656 casos en el año 2002. Constituye un grave problema de salud global por su morbilidad y mortalidad, cuyo impacto es devastador a nivel personal, social y económico. El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se transformó en los últimos 50 años y el cáncer mamario ha pasado a ser un problema de salud pública [11, 12].

De acuerdo al perfil epidemiológico a partir de los sistemas de información y vigilancia epidemiológica en México en el que realizaron un análisis descriptivo de las bases de datos de morbilidad (SUIVE, RHNM) y de la base de datos de mortalidad del INEGI, reportaron los siguientes datos: En el SUIVE entre 2000 y 2006 se registraron 33,671 casos de cáncer de mama. En el 2000, la tasa fue 3.72 por 100,000 habitantes y en 2006, de 8.43, además los grupos de edad más afectados fueron de 25 a 44 y de 60 a 64 años. Entre 1998 y 2003, el RHNM reportó 63,833 diagnósticos, el 99.7% fueron mujeres. Los grupos de edad más afectados según el RHNM fueron de 25 a 44, 50 a 59 y 65 en adelante. El adenocarcinoma ductal infiltrante representó 74.7% y los estados del Norte del país presentaron tasas de mortalidad más altas, figuras 2 y 3 [13].

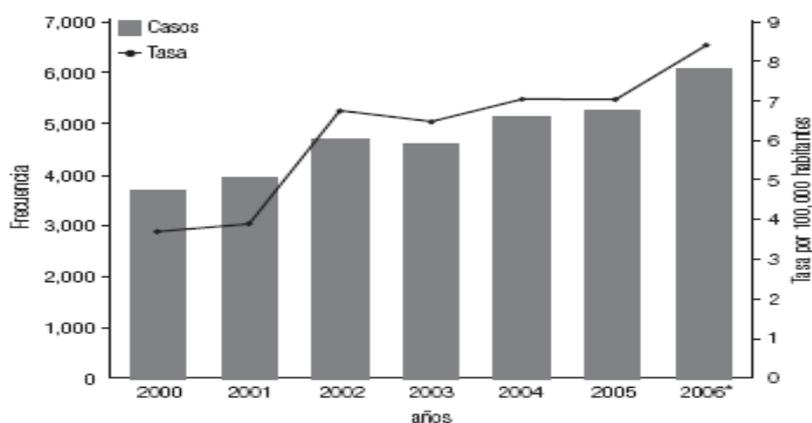


Figura 2. Casos y tasa de incidencia del cáncer de mama. México 2000-2006.SUIVE. Modificada de Cabrera y cols. [13].

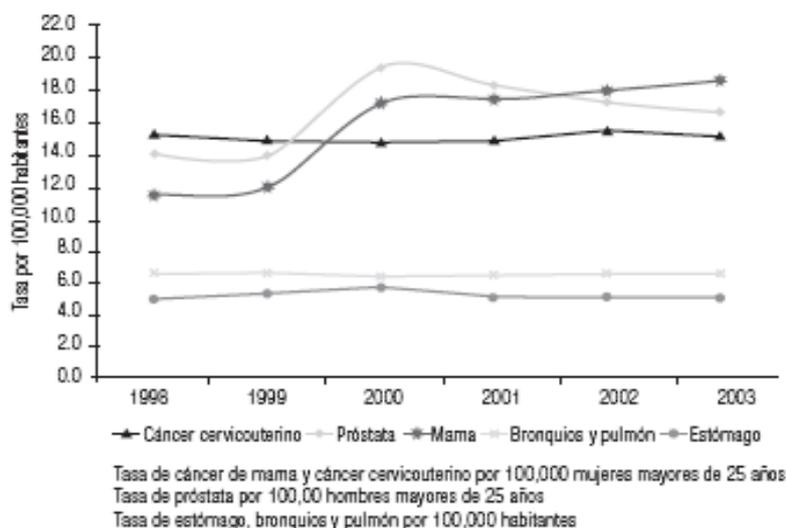


Figura 3. Tasa de mortalidad de los principales cánceres 1998-2003. Modificada de Cabrera y cols. [13].

2.2 Anatomía.

Los hombres y las mujeres tienen glándulas mamarias, y en condiciones normales sólo se desarrollan plenamente en las mujeres. Las glándulas mamarias tienen una misión reproductora accesoria para la mujer, y son estructuras rudimentarias y carentes de función para los hombres. Las mamas representan la estructura superficial más destacada de la pared torácica anterior, sobre todo en el sexo femenino. Las glándulas mamarias se localizan en el tejido subcutáneo y cubren los músculos pectorales (mayor y menor). La cantidad de grasa que rodea el tejido glandular establece el tamaño de las mamas. El pezón es el elemento que más sobresale de la glándula y está rodeado de una zona pigmentada y circular de la piel, la areola.

La base más o menos circular (lecho) de la glándula mamaria femenina se extiende en sentido transversal, desde el borde lateral del esternón hasta la línea axilar media y en sentido vertical, desde la 2ª hasta la 6ª costillas. Una pequeña porción de la glándula mamaria se extiende a lo largo del borde inferolateral del músculo pectoral mayor en dirección a la axila, originando la cola axilar (de Spence), como se puede observar en la figura 4 [14].

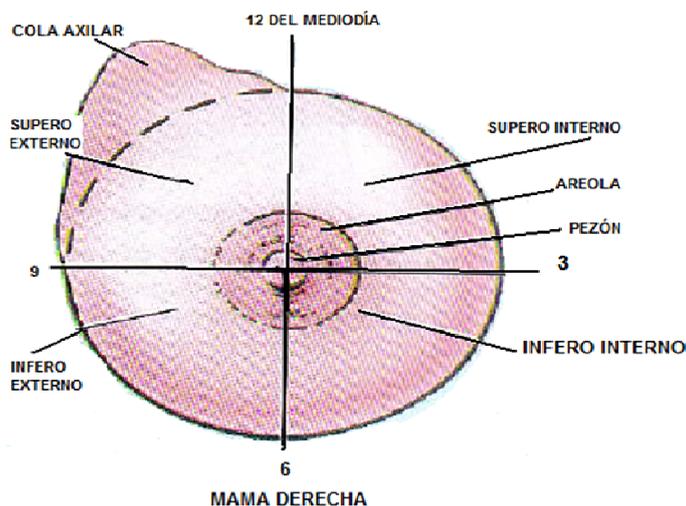


Figura 4. Cuadrantes mamarios. Modificada de Moore [14].

Los dos tercios de la glándula reposan sobre la fascia pectoral profunda que cubre el músculo pectoral mayor; el otro tercio descansa en la fascia que cubre el músculo serrato anterior.

Entre la glándula y la fascia pectoral profunda se encuentra un plano o espacio virtual de tejido conjuntivo laxo, el espacio (bolsa) retromamario. Este plano, que contiene una pequeña cantidad permite cierto movimiento de la glándula sobre la fascia pectoral como se puede observar en la figura 5.

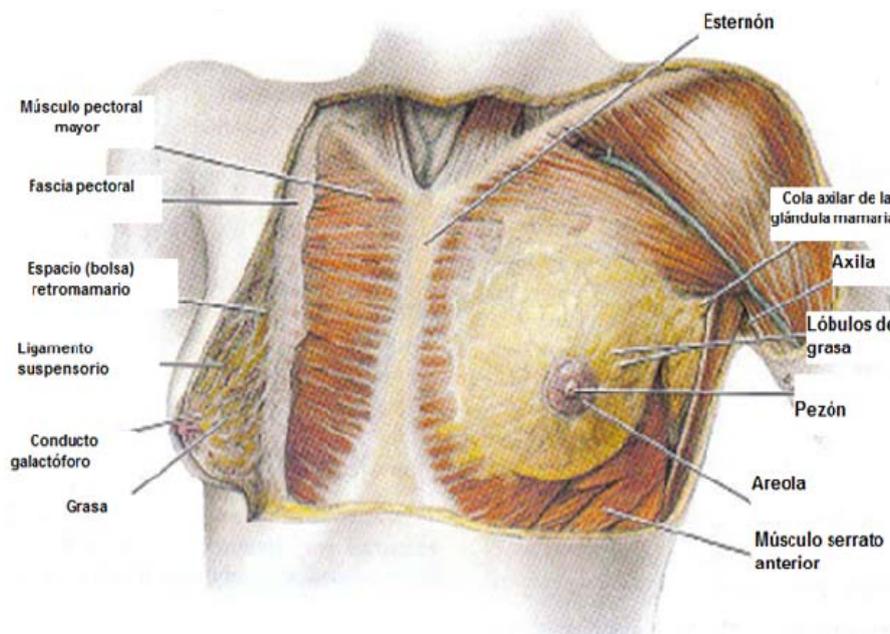


Figura 5. Disección superficial de la región pectoral femenina. Modificada de Moore. [14].

La glándula mamaria se inserta con firmeza en la dermis de la piel que la cubre a través de ligamentos cutáneos (*retinacula cutis*), los llamados ligamentos suspensorios (de Cooper). Estas condensaciones fibrosas del estroma del tejido conjuntivo, que se encuentran perfectamente desarrolladas en la parte superior de la glándula, dan soporte a los lóbulos glandulares como se puede observar en la figura 6.

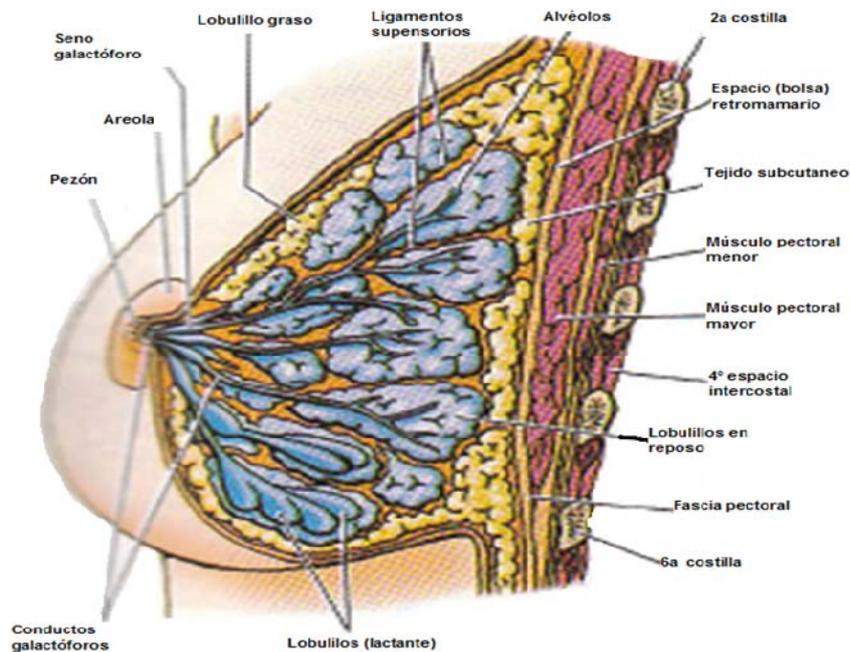


Figura 6. Sección sagital de la glándula mamaria y de la pared torácica anterior.

Modificada de Moore. [14].

Durante la pubertad (de los 8 a los 15 años), las glándulas crecen con normalidad por el desarrollo de las mismas y el depósito progresivo de grasa. Las areolas y los pezones también aumentan. El tamaño y la forma de la mama provienen de factores genéticos, raciales y alimentarios. Los conductos galactóforos forman esbozos que dan origen a 15-20 lóbulos de tejido glandular, que constituyen la glándula. Cada lóbulo está drenado por un conducto galactóforo que suele desembocar de manera independiente en el pezón. Los conductos convergen hacia el pezón. En la profundidad de la areola, cada conducto tiene una porción dilatada, el seno galactóforo, donde se acumula una pequeña gota en las madres lactantes. Cuando el pequeño empieza a mamar, la compresión de la areola (y del seno galactóforo inferior) exprime las gotas acumuladas y anima al pequeño a continuar alimentándose mientras que el “reflejo de salida de la leche”, mediado por las hormonas prosigue y se segrega. La areola contiene muchas glándulas sebáceas que aumentan durante el embarazo y segregan una sustancia oleosa que lubrica y protege la areola y pezón, muy sensibles al dolor y la irritación cuando se inicia la lactancia.

Los pezones son prominencias cónicas y cilíndricas situadas en el centro de la areola. Carecen de grasa, pelo y glándulas sudoríparas. La punta del pezón está fisurada y los conductos galactóforos se abren por él como se puede observar en la figura 7. Los pezones constan, en su mayor parte, de fibras de músculo liso con disposición circular que comprimen los conductos galactóforos durante la lactancia y enderezan el pezón como respuesta a los estímulos.

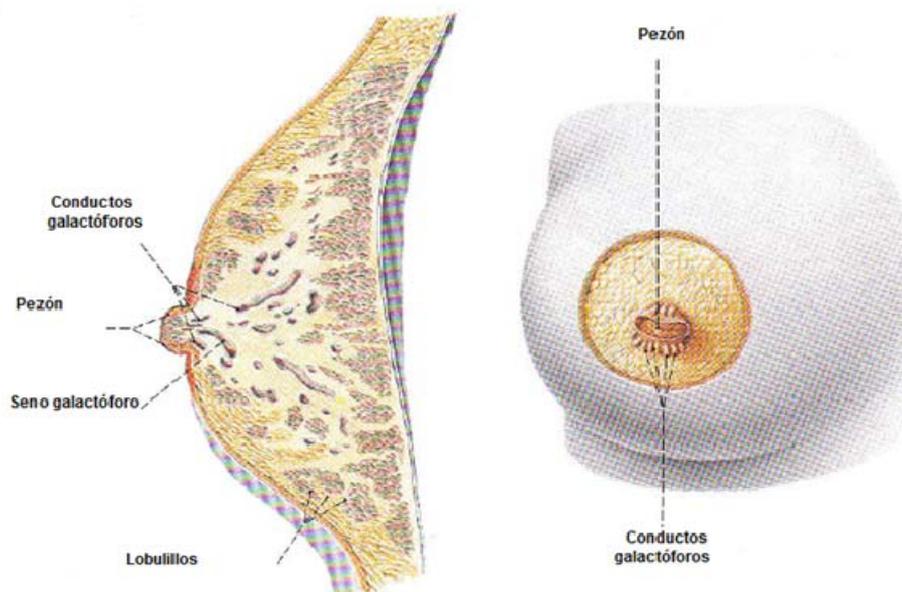


Figura 7. Visión lateral (corte sagital) y anterior de la mama de una mujer embarazada [15].

Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas modificadas; por eso carecen de cápsula o vaina especiales. El contorno redondeado y la mayor parte del volumen mamario se deben a los lóbulos adiposos, salvo durante el embarazo, momento en que la glándula mamaria crece y se forma nuevo tejido glandular.

Los alvéolos que segregan la leche adoptan la forma de racimos de uva. La glándula mamaria de la mayoría de las mujeres crece un poco durante el ciclo menstrual por el aumento de las hormonas gonadotropas FSH y LH [16].

Vascularización de la glándula mamaria:

La irrigación arterial de la glándula proviene en primer lugar de las ramas mamarias mediales de las ramas perforantes y ramas intercostales anteriores de la arteria torácica interna, que se origina en la subclavia. En Segundo lugar de las arterias torácica lateral y toracoacromial, ramas de la arteria axilar. Por último de las arterias intercostales posteriores, ramas de la aorta torácica que emergen en el 2°, 3° y 4° espacio intercostal, como se puede observar en la figura 8.

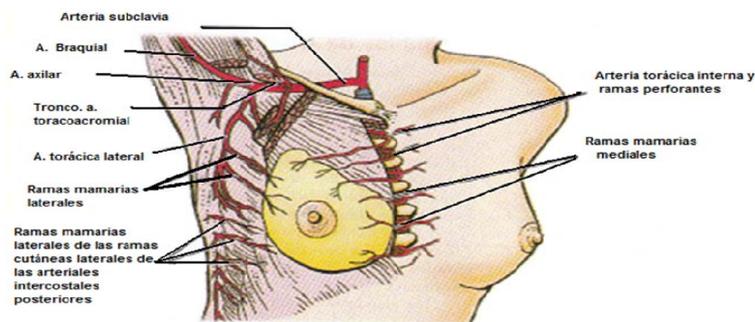


Figura 8. Vascularización (arterias) de la glándula mamaria. Modificada de Moore. [14].

Del drenaje venoso de la glándula mamaria se ocupa sobre todo la vena axilar, aunque parte lo conduce la vena torácica interna, como se puede observar en la figura 9.

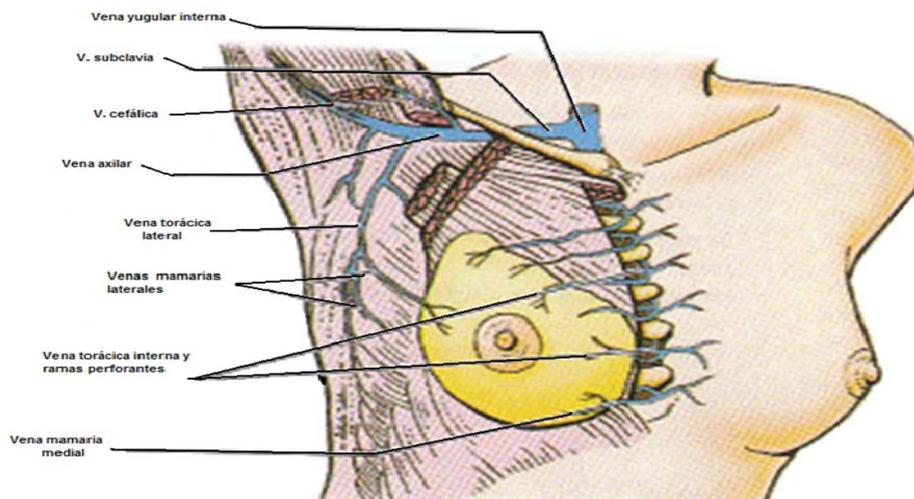


Figura 9. Vascularización (venas) de la glándula mamaria. Modificada de Moore. [14].

El **drenaje linfático** de la glándula mamaria tiene importancia en las metástasis de las células cancerosas. La linfa pasa del pezón, areola y lóbulos de la glándula hacia el plexo linfático subareolar. La mayor parte de la linfa (más del 75%), sobre todo la de los cuadrantes laterales, drena a los ganglios linfáticos axilares, en principio y sobre todo a los ganglios pectorales (anteriores); sin embargo, parte de la linfa drena de manera directa a otros ganglios axilares o incluso a los ganglios interpectoriales, deltopectoriales, supraclaviculares o cervicales profundos inferiores. Gran parte de la linfa restante, sobre todo la de los cuadrantes mediales, drena a los ganglios paraesternales o a la glándula mamaria contralateral, mientras que la linfa de los cuadrantes inferiores llega hasta la profundidad, a los ganglios frénicos inferiores (abdominales).

Los vasos linfáticos de la piel de la glándula, con excepción del pezón y de la areola, drenan a los ganglios axilares, cervicales profundos inferiores e infraclaviculares y también a los ganglios paraesternales de ambos lados. La linfa de los ganglios axilares desemboca en los ganglios infraclaviculares y supraclaviculares y llega luego hasta el tronco linfático subclavio, que también drena la linfa del miembro superior. La linfa de los ganglios paraesternales ingresa en el tronco broncomediastínico, que drena las vísceras torácicas, como se puede observar en la figura 10.

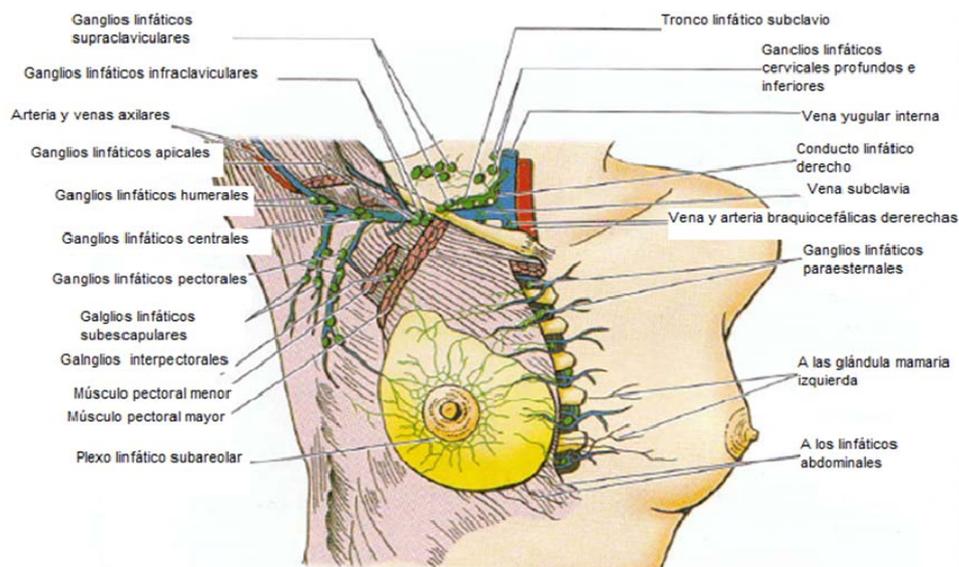


Figura 10. Drenaje linfático de la glándula mamaria. Modificada de Moore. [14].

La terminación de estos troncos linfáticos es variable. Estos troncos se agrupan entre sí y con el tronco linfático yugular, que drena la cabeza y cuello, para formar un conducto linfático derecho muy corto, o bien terminan en el conducto torácico del lado izquierdo. En muchos casos los troncos desembocan de manera independiente en la unión entre las venas yugular interna y subclavia para formar las venas braquiocefálicas, esto se puede observar en la figura 11.

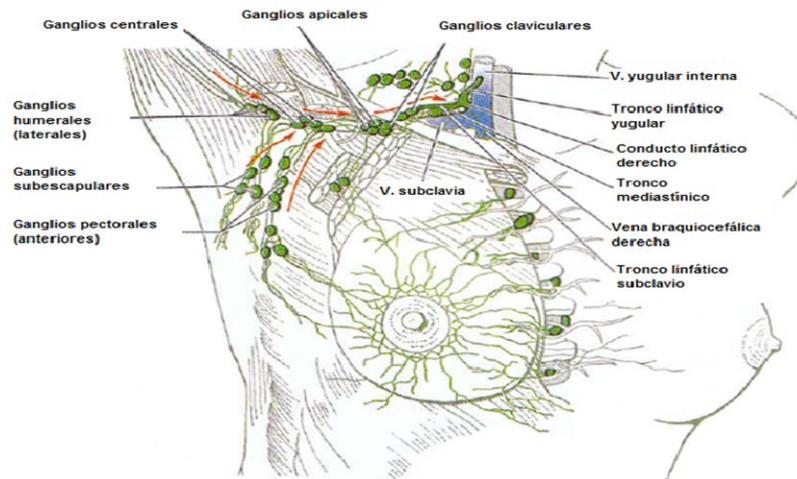


Figura 11. Patrón de drenaje linfático de los ganglios linfáticos axilares. Modificado de Moore. [14].

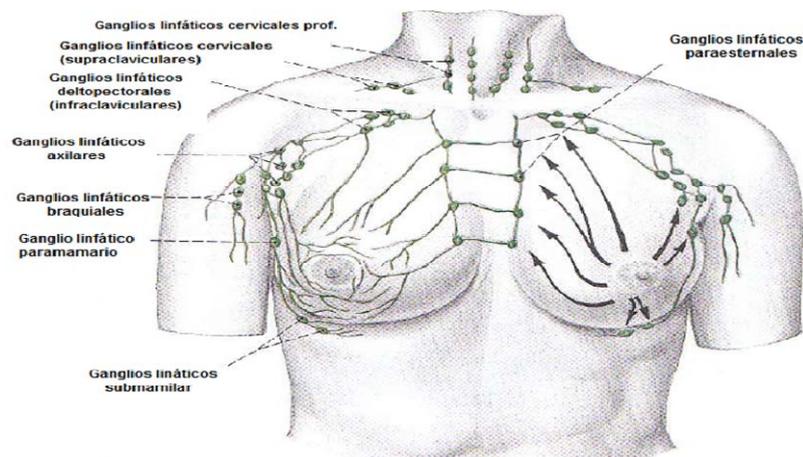


Figura 12. Drenaje linfático de la glándula mamaria. Comunicaciones de los vasos linfáticos de ambos lados y el flujo eferente de la linfa hacia los ganglios linfáticos intratorácicos. Modificado de Putszl. [15].

Nervios de la glándula mamaria.

Los nervios de la glándula mamaria provienen de ramos cutáneos anteriores y laterales del 4° a 6° nervios intercostales. Los ramos ventrales primarios de T1 a T11 se denominan nervios intercostales porque discurren dentro de los espacios intercostales. Los ramos comunicantes comunican cada ramo ventral con un tronco simpático. Los ramos de los nervios intercostales atraviesan la fascia profunda que cubre el músculo pectoral mayor y llegan hasta la piel, incluida la mama situada en el tejido subcutáneo sobre el músculo citado. Los ramos de los nervios intercostales conducen fibras sensitivas para la piel mamaria y fibras simpáticas para los vasos sanguíneos de la glándula mamaria y el músculo liso de la piel suprayacente y del pezón, como se puede observar en la figura 13.

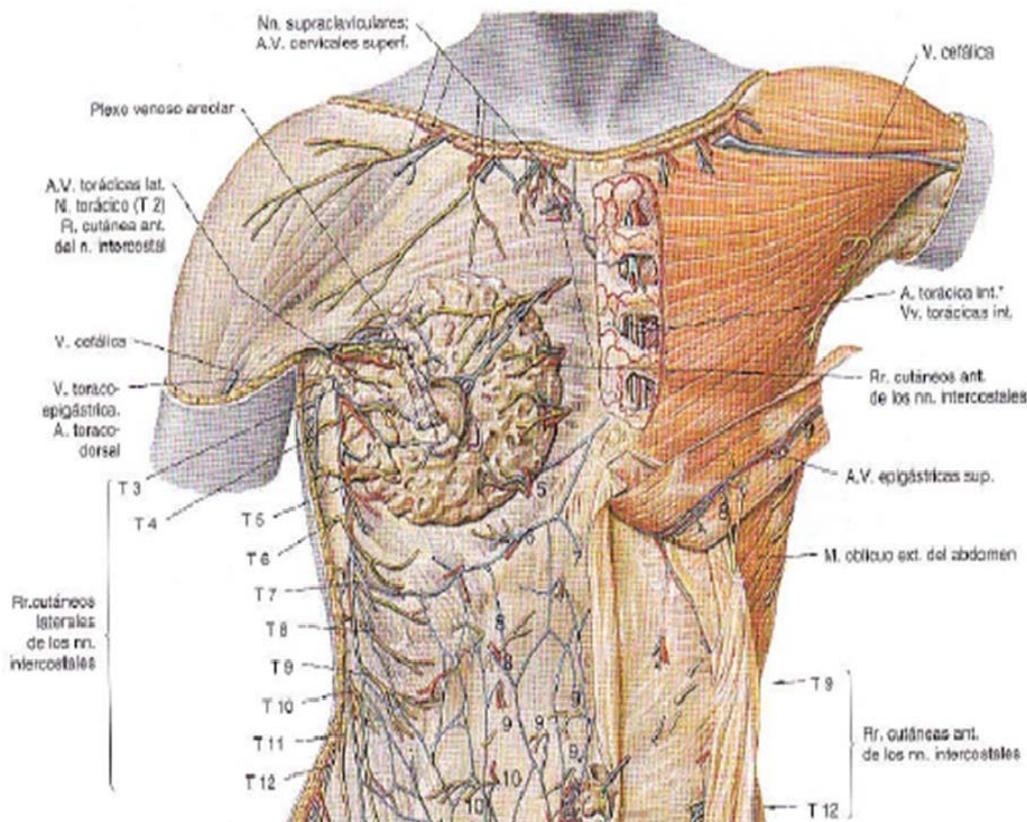


Figura 13. Visión anterior de los vasos, nervios y músculos de la pared torácica. Modificada de Putszl. [15].

2.3 Embriología y fisiología.

Las glándulas mamarias surgen como proyecciones del epitelio (en este caso ectodérmicas) hacia el mesénquima en respuesta a influencias inductivas procedentes de éste último. La primera evidencia morfológica del desarrollo de la glándula mamaria es la aparición de dos bandas de engrosamientos ectodérmicos llamadas líneas mamarias, que discurren a lo largo de las paredes ventrolaterales del cuerpo de los embriones de ambos sexos hacia la sexta semana. Las proyecciones epiteliales de los conductos mamarios se asocian con dos tipos de mesodermo: fibroblástico y adiposo. Las interacciones inductivas con los componentes adiposos del tejido conectivo son responsables de la forma característica del sistema de conductos mamarios.

El mesodermo controla el patrón de ramificación del epitelio ductal, las propiedades funcionales de los conductos mamarios son intrínsecas del componente epitelial. En relación con su función y como estructura de característica sexual secundaria, las glándulas mamarias tienen una elevada capacidad de respuesta a los estímulos hormonales del medio [17]. Figura 14.

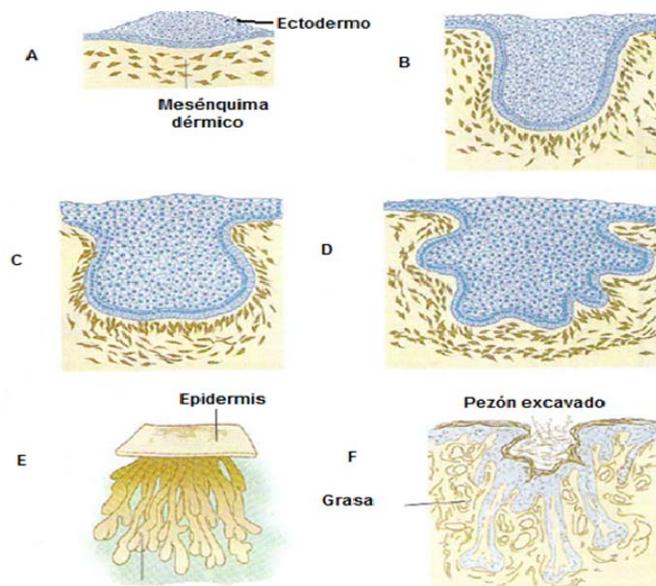


Figura 14. Etapas del desarrollo embrionario de la glándula mamaria en humanos. A. 6 semanas, B. 7 semanas, C. 10 semanas, D. 4 meses, E. 6 meses, F. 8 meses. Modificada de Carlson [17].

El desarrollo posnatal del tejido de la glándula mamaria es regulado por la acción hormonal. El sistema sencillo de conductos mamarios que se creó en el embrión permanece en este estado hasta que se expone a la acción hormonal del comienzo de la pubertad. Los niveles crecientes de estrógenos circulantes y otros cambios hormonales menos evidentes estimulan la proliferación de los conductos mamarios y el aumento del tejido adiposo situado por debajo de ellos, figura 15.

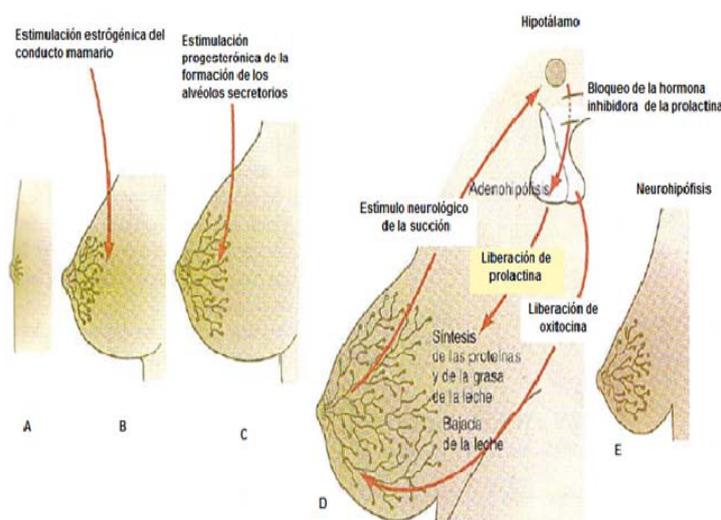


Figura 15. Desarrollo de los conductos mamarios y control hormonal del desarrollo y función de la glándula mamaria en humanos. A. Recién nacida, B. adulta joven, C. adulta, D. adulta lactante, E. adulta después de la lactancia. Modificada de Carlson. [17].

El otro gran cambio en el ciclo del desarrollo del tejido mamario tiene lugar durante el embarazo, aunque pueden detectarse cambios cíclicos menores en cada período menstrual. Durante el embarazo, los niveles elevados de progesterona, junto con la prolactina y el lactógeno placentario, estimulan el desarrollo de los alvéolos secretorios en los extremos de las ramificaciones de los conductos. Con el continuo desarrollo de los alvéolos, en las células epiteliales se acumula gran cantidad de organelos citoplásmicos, como el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, que están implicados en la síntesis y la secreción de las proteínas. Durante la lactancia se producen interacciones recíprocas entre la glándula mamaria y el cerebro. Estimuladas por la secreción de prolactina por la adenohipófisis, las células alveolares sintetizan las proteínas de la leche (caseína y α lactalbúmina) y lípidos.

En respuesta al estímulo de la succión, la liberación de oxitocina por la neurohipófisis desencadena la eyección de leche. La oxitocina causa la contracción de las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos. La succión también inhibe la liberación del factor liberador de hormona luteinizante por el hipotálamo, lo que ocasiona la inhibición de la ovulación. Cuando se suspende la lactancia, la reducción de la secreción de prolactina y los efectos inhibitorios de la leche no eyectada de los alvéolos mamarios conducen al cese de la producción de leche. Los alvéolos mamarios involucionan y el sistema de conductos de la glándula mamaria recuperan su estado previo al embarazo, figura 16.

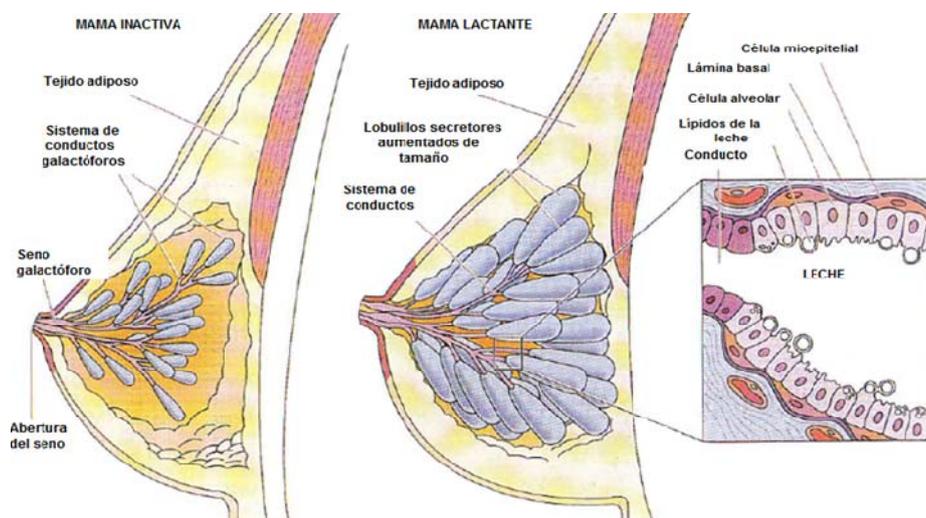


Figura 16. Diferencias glandulares entre la mama inactiva y la lactante ó activa. Modificada de Gartner. [18].

Las glándulas mamarias se consideran dentro de las glándulas exocrinas multicelulares y estas están constituidas por acúmulos de células secretoras distribuidos en diversos grados de organización. Se considera una glándula exocrina por que libera su producto en un sistema de conductos que se abren al epitelio de revestimiento del que se originaron.

Las células de las glándulas exocrinas manifiestan tres mecanismos diferentes para descargar sus productos secretados: merocrino, apocrino y holocrino. Una parte de la secreción de la glándula mamaria los lípidos de la leche, es liberada de manera apocrina.

Estas células secretoras no actúan por sí solas sino que lo hacen como órganos secretores. La glándula mamaria entonces es una glándula exocrina multicelular compuesta ya que su parte ductal se ramifica. De acuerdo a su morfología se considera como tubuloacinar compuesta [17,18, 19].

2.4 Factores de riesgo y predicción.

El Cáncer mamario es 3 o 4 veces más probable en mujeres cuyas madres o hermanas lo presentaron respecto de quiénes no tienen ese antecedente familiar. El riesgo se eleva aún más en pacientes cuyo cáncer materno o fraterno se presentó antes de la menopausia o era bilateral y en aquellas con antecedente familiar de cáncer mamario en dos o más parientes de primer grado. Sin embargo, no hay antecedente de cáncer mamario en parientes femeninas de más de 80% de las mujeres afectadas.

Las nulíparas y las personas cuyo primer embarazo a término ocurrió después de los 35 años tienen 1.5 veces mayor incidencia de cáncer mamario que las múltiparas. La menopausia natural tardía (después de los 50 años) y la menarquía temprana (antes de los 12 años) se relacionan con un ligero aumento del riesgo. Los cambios fibroquísticos, cuando se acompañan de alteraciones proliferativas, papilomatosis o hiperplasia epitelial atípica, se vinculan con una mayor incidencia.

Una mujer que presentó cáncer en una mama tiene mayor riesgo de que aparezca en la otra. En ella surge un cáncer contralateral con una tasa de 1 o 2% por año. Las mujeres con cáncer del cuerpo uterino poseen mucho mayor riesgo de cáncer mamario que el de la población general y aquéllas con cáncer mamario tienen un riesgo aumentado de cáncer endometrial. En general las tasas comunicadas de países en desarrollo son bajas y en los desarrollados altas. Los factores de la dieta (un mayor consumo de grasas) pueden propiciar algunas diferencias en la incidencia. Hay pruebas de que la administración de estrógenos a mujeres posmenopáusicas puede dar como resultado un riesgo un poco mayor de cáncer mamario, pero solo con dosis altas y a largo plazo. La administración concomitante de progesterona y estrógenos puede reducir de manera notoria la incidencia de cáncer mamario, en comparación con el uso de estrógenos solos.

El cáncer mamario aparece hasta en 85% de las mujeres con mutaciones del gen BRCA1 durante su vida. Otros genes se vinculan con un mayor riesgo de cáncer mamario y de otros tipos, como BRCA2, la mutación de ataxia-telangiectasia, y de la p53 (gen supresor tumoral). Las mutaciones p53 se han reconocido en casi el 1% de los cánceres mamaros de mujeres menores de 40 años [20].

Los genes de alta susceptibilidad a cáncer de mama (BRCA1 y BRCA2) se transmiten en forma autosómica dominante con penetrancia variable. Los individuos portadores de mutaciones en estos genes de susceptibilidad a cáncer de mama tienen un aumento significativo de riesgo a lo largo de su vida de padecer cáncer comparado con el riesgo de la población general [21].

Múltiples estrategias se han utilizado para identificar los factores genéticos predisponentes del cáncer de mama, como la búsqueda y detección genes con mutaciones que sean candidatos los genes como CHEK2, mutaciones en ATM, BRIP1 y PALB2, los que se han encontrado con poca frecuencia y confieren una penetrancia intermedia en el cáncer de mama. Por lo que más del 70% de la predisposición de cáncer de mama sigue siendo inexplicable[22].

El Cáncer de la glándula mamaria es un padecimiento heterogéneo; la identificación continua de marcadores que apoyen en la predicción de la respuesta a la terapia y el pronóstico del padecimiento, es una tarea fundamental. A la fecha se ha logrado establecer el poder pronóstico de solo unos cuantos marcadores. Los clásicos son el tamaño tumoral, el número de ganglios positivos y la permeación vascular linfática. El receptor de estrógeno, es probablemente el factor pronóstico con mayor poder predictivo en su manejo. El receptor de progesterona, también es un marcador ampliamente usado, aunque su valor pronóstico no está completamente establecido. Por su parte HER-2 se ha convertido en el factor de mal pronóstico evaluado en forma rutinaria. Otros factores no han demostrado un impacto semejante en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.

Los factores pronósticos son cualquier característica del tumor o del paciente que puede usarse para predecir la historia natural de la neoplasia y por ende del periodo libre de enfermedad, recidiva y sobrevida de las pacientes. Los factores predictivos indican la respuesta a una terapia en especial. En el manuscrito del consenso de 1999 del Colegio Americano de Patólogos los factores pronósticos los clasificaron en tres categorías.

La categoría I incluye aquellos factores que proveen información en el manejo del paciente y que deben ser usados de manera rutinaria, la categoría II son factores biológicos y clínicos que han sido estudiados, pero que todavía se necesita información estadística más sólida para ser validados y pueden ser opcionales, la categoría III son todos aquellos factores que no han sido totalmente estudiados, tabla 2.

CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III
<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño del tumor. • Estatus ganglionar. • Grado histológico. • Tipo histológico. • Expresión de RH 	<ul style="list-style-type: none"> • HER-2-neu, p53. • Permeación vascular o linfática. • Marcadores de proliferación celular (ki-67, MIB-I). • Análisis de DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de ploidía de DNA. • Angiogénesis EGF • TGFα. • bcl-2. • Ps2. • Catepsina 2.

Tabla 2. Factores pronósticos en cáncer de glándula mamaria. Consenso del Colegio Americano de Patólogos en el año 1999. Modificada de Pérez et al. [23].

Tamaño del tumor. Este es un factor pronóstico importante ya que tiene una asociación directa con la sobrevida y el estado ganglionar en la paciente. El carcinoma mínimo de glándula mamaria se ha definido como aquel carcinoma ductal in situ, lobulillar in situ o carcinoma invasor que mide menos de 0.5 cm de diámetro. Es importante reportar el tamaño del tumor de la forma más exacta posible por lo que se pueden seguir las siguientes recomendaciones:

- El tumor se debe medir cuando menos en dos dimensiones y el diámetro mayor es el que se toma como referencia para la estadificación.
- El tamaño macroscópico y microscópico deben correlacionarse. En tumores con amplio componente in situ, sólo se tomará como tamaño del componente invasor, el cual se debe medir durante el examen microscópico.
- Cuando se encuentran dos o más tumores, estos se deben reportar por separado

Estado ganglionar. El mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer temprano de glándula mamaria es la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares. El 20 a 30% de las pacientes con ganglios negativos presentan recurrencia dentro de los primeros 10 años, mientras que recurren el 70% de los pacientes con ganglios axilares positivos.

El número de ganglios afectados también es importante, ya que en pacientes con 4 o más ganglios afectados tienen un peor pronóstico. Actualmente se considera que una disección de axila es adecuada cuando incluye 15 a 20 ganglios. El reporte de patología incluye la cantidad total de ganglios, especificando el número afectado por metástasis, el estado de su cápsula y la presencia de neoplasia en el tejido adiposo periférico.

Grado histológico. Este es un factor pronóstico importante ya que ha mostrado tener valor para predecir la sobrevida en pacientes con cáncer de glándula mamaria. El método de gradificación histológica que se utiliza actualmente, es el sistema de Scarff-Bloom-Richardson modificado que consta de los siguientes parámetros: El alto grado histológico se ha relacionado con mayor frecuencia a metástasis, recurrencias tumorales, muerte por enfermedad metastásica, menor intervalo libre de enfermedad y sobrevida global más corta.

Receptores hormonales. La expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) positivos se correlaciona con tumores de bajo grado histológico que responden a tratamiento hormonal sobretodo en pacientes post menopáusicas. Solamente hay una diferencia absoluta del 8 a 10% en sobrevida libre de enfermedad para mujeres con tumores de mama receptores positivos en comparación con aquellas con receptores negativos. Sin embargo, son factores altamente predictivos de respuesta a terapia hormonal, aproximadamente 77% de las pacientes con tumores RE y RP positivos responden a terapia hormonal, 27% responden cuando son RE positivos y RP negativos, 46% responden cuando son RE negativos y RP positivos. El 11% de las pacientes no responden cuando ambos receptores son positivos, y aproximadamente el 33% de las pacientes con receptores positivos no responden a terapia hormonal.

HER2/neu (c-erbB-2). HER2 es miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico constituido por cuatro miembros: HER 1 (erb-B1), HER-2 (erb-B2), HER-3 (erb-B3) y HER-4 (erb-B4). El proto-oncogén HER-2/ neu está localizado en el cromosoma 17q y codifica para una glicoproteína transmembranal de 185 KDa, que posee actividad tirosina cinasa intrínseca. La amplificación de HER-2/neu o sobre expresión de la proteína, se ha identificado en 10 a 34 % de los carcinomas de glándula mamaria.

Proteína p-53. p53 Es un gen supresor del cáncer situado en el cromosoma 17 p13.1; es el sitio más frecuente de las alteraciones genéticas del cáncer humano. El 50% o más de los tumores humanos contienen mutaciones de este gen. La pérdida homocigótica del gen p-53 aparece en casi todos los tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama. El hecho de que las mutaciones de p-53 sean frecuentes en distintos tumores, indica que la proteína p-53 actúa como guardián esencial contra el desarrollo del cáncer. p-53 advierte que el DNA se encuentra dañado y ayuda a su reparación, provocando un arresto en G1 e induciendo a los genes que intervienen en la reparación del DNA. Si resulta imposible la reparación, p-53 conduce a la célula hacia la apoptosis. En caso de pérdida homocigótica de p-53, el DNA dañado no puede ser reparado, las mutaciones se convierten en fijas cuando la célula se divide y las células entran en un camino sin retorno hacia la transformación maligna. Las mutaciones resultan en una sobre-expresión de p-53.

bcl -2. Este gen se ha reportado como un marcador de buen pronóstico y un factor predictivo de respuesta al tratamiento con Tamoxifeno. La expresión de bcl-2 se asocia a tumores con RE positivo y las pacientes tienen sobrevida libre de enfermedad más larga.

Otros factores predictivos importantes son:

La **permeación linfática** ya que los émbolos tumorales dentro de los vasos linfáticos predicen recurrencia local y sobrevida global más corta.

La **invasión vascular** es la penetración de células neoplásicas en la luz de un vaso arterial ó venoso. Las metástasis viscerales de cáncer de mama se han observado en 67% de los pacientes con invasión en comparación con solo el 35 % de los pacientes sin ella. Así también las recurrencias son más frecuentes en pacientes con invasión vascular.

El **infiltrado linfoplasmocitario**, este hallazgo en carcinomas ductales sin patrón específico, se ha relacionado a mal pronóstico.

Las **características del estroma**, las neoplasias que contienen mínima reacción estromal son bien circunscritas con grado nuclear e histológico alto, reacción linfo-plasmocitaria prominente y son receptores de estrógeno negativos. Por otro lado, los carcinomas con estroma fibrótico, esclerosis, con aspecto estelar son moderadamente diferenciados con escasa reacción linfoplasmocitaria y son receptores de estrógeno positivos.

La **angiogénesis**, el aumento de volumen de una neoplasia y su capacidad para formar metástasis requieren de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Se ha observado que el incremento en la densidad de microvasos también aumentó el riesgo de metástasis.

El estudio y determinación de los factores pronósticos y predictivos principales son de ayuda para el médico clínico y patólogo en la toma de decisiones en el diagnóstico y tratamiento de las pacientes con patología de glándula mamaria [23].

2.5 Detección temprana.

La detección del cáncer mamario antes de su diseminación a los ganglios axilares incrementa de manera considerable la posibilidad de supervivencia y casi 85% de esas mujeres sobrevivirá al menos cinco años. Son necesarias la exploración física y la mamografía para conseguir el máximo beneficio de los programas de detección, ya que el 35% a 50% de los cánceres mamarios tempranos se pueden descubrir sólo por mamografía y otro 40% sólo por palpación clínica.

La probabilidad de cáncer en una mamografía de detección tiene relación directa con la valoración de Breast Imaging and Reporting Data System (BIRADS). Los principales factores de riesgo conocidos del cáncer de mama están asociados a la exposición prolongada a estrógenos, son indicadores de estilos de vida y patrones reproductivos, y por esto resultan difíciles de modificar. Reducir la mortalidad requiere, entonces, mejorar la detección temprana y las estrategias de tratamiento.

La NOM-041 reconoce 3 tipos de intervenciones específicas para la detección del cáncer, la autoexploración, el examen clínico y la mastografía.

La **autoexploración mamaria** es una técnica de detección del cáncer mamario basada en la observación y palpación que hace la mujer en sus propias mamas. En un alto porcentaje son las mujeres quienes detectan los nódulos que indican una alteración mamaria. La autoexploración es referida por algunos críticos como una herramienta de poca utilidad ya que no detecta lesiones tempranas. En estudios realizados en México con respecto a la autoexploración se ha concluido que las mujeres son capaces de detectar lesiones de, al menos, 1 cm y, cuando son superficiales, de hasta 0.5 cm una vez que han recibido capacitación. El impacto mundial de la autoexploración mamaria muestra datos inconsistentes y no refleja disminución de la mortalidad, pero algunos reportes refieren un mejor pronóstico para las pacientes, ya que se detectan lesiones en etapas clínicas I y II. El 90% de los casos de cáncer de mama en México son detectados gracias a que la propia paciente detecta un abultamiento o nódulo, y en estos casos ya se trata de un estadio avanzado de la patología [24].

En el **examen clínico** se debe obtener una historia clínica completa es el primer paso del examen clínico mamario, y ésta debe incluir antecedentes importantes tales como el estado hormonal y la historia familiar de cáncer de mama. El examen clínico mamario debe incluir una exploración física en que se observará la configuración general y se palparán los senos revisando también axilas y pezones.

Signos y síntomas: La manifestación de presentación en casi el 70% de las pacientes con esta patología es una tumoración casi siempre indolora. Son síntomas menos frecuentes la presencia de dolor, secreción del pezón, erosión, retracción, aumento de volumen o prurito en el pezón, eritema, solidez generalizada, crecimiento o disminución de volumen de la mama. Rara vez, el principal síntoma puede proceder de una anomalía axilar o edema del brazo. El dolor dorsal u óseo, la ictericia o la pérdida de peso pueden indicar la presencia de metástasis sistémicas. La frecuencia relativa de la presencia del carcinoma es variable según el sitio anatómico, el 60% de los carcinomas se encuentra en el cuadrante superoexterno de la glándula mamaria.

En la **mamografía** de escrutinio se busca visualizar lesiones no-palpables (es decir, menores de 0.5 cm si se trata de nódulos), calcificaciones (nunca palpables por su reducido tamaño), asimetrías en la densidad mamaria, y/o distorsión de la arquitectura de la glándula. Los nódulos son objetos que aparecen en ambas proyecciones con densidad media y alta, se confunden con el tejido glandular, y sus contornos son indicadores de malignidad. Las calcificaciones son acumulaciones cristalinas de calcio, de tamaños de cientos de micras, cuyo patrón de agrupación y morfología es indicador de malignidad. Sólo la mamografía puede detectar las calcificaciones. La imagen mamográfica sólo permite visualizar estos indicadores, y la severidad de la lesión evaluada por las características de la imagen llevará al radiólogo a solicitar la toma de una biopsia del tejido sospechoso. La malignidad del tumor sólo se determina a través del análisis patológico de la muestra citológica o histológica [20, 24].

Pruebas diagnósticas:

- **Biopsia:** El diagnóstico de cáncer mamario depende al final del estudio de tejidos o células extraídos por biopsia. Nunca debe instituirse tratamiento sin un diagnóstico inequívoco de cáncer por histología o citología.
 - a. Citología del material aspirado con aguja fina es una técnica útil por la que se aspiran células con una pequeña aguja y se revisan por citología.
 - b. Biopsia con aguja grande (en sacabocados) permite retirar un cilindro de tejido con una gran aguja de corte.
 - c. **Biopsia abierta** bajo anestesia local como procedimiento individual antes de decidir el tratamiento definitivo, es el método más confiable B

Diagnóstico diferencial: Las lesiones a considerar en el diagnóstico diferencial del cáncer mamario son, en orden descendente de frecuencia: Cambios fibroquísticos mamarios, Fibroadenoma, papiloma Intraductal, lipoma y necrosis grasa [25].

2.6 Estadificación.

El “*American Joint Committee on Cancer*” y la “*International Union Against Cancer*” acordaron un sistema TNM (Tumor, ganglios linfáticos regionales y metástasis distantes) de estadificación del cáncer mamario. El cáncer de mama se ha clasificado en cuatro grupos para estandarizar las comparaciones de los resultados de las diferentes modalidades terapéuticas y para guiar el tratamiento:

- Estadio 0. Carcinoma Ductal in Situ o Carcinoma Lobulillar in Situ (tasa de supervivencia a los 5 años del 92 %).
- Estadio I. Carcinoma infiltrante de 2 cm. o menos de diámetro sin afectación de ganglios linfáticos y sin metástasis a distancia (tasa de supervivencia a los 5 años del 87%).
- Estadio II. Carcinoma infiltrante de 5 cm. o menos de diámetro con ganglios linfáticos axilares afectados pero movibles y sin metástasis a distancia, o bien carcinoma infiltrante mayor de 5 cm. de diámetro sin metástasis ganglionares ni metástasis a distancia (tasa de supervivencia a los 5 años del 75%).
- Estadio III: Carcinoma de mama con más de 5 cm. de diámetro y con metástasis ganglionares, o bien cualquier cáncer de mama con ganglios axilares metastásicos fijos o fusionados; o bien cualquier cáncer de mama con afectación de ganglios linfáticos mamarios internos ipsolaterales; o bien cualquier cáncer de mama con afectación cutánea, fijación del pectoral a la pared torácica, edema o carcinoma inflamatorio clínico, en ausencia de metástasis a distancia (tasa de supervivencia a los 5 años del 46%).
- Estadio IV: Cualquier forma de cáncer de mama con metástasis a distancia (incluidos los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsolaterales) (tasa de supervivencia a los 5 años del 13%) [26].

En el año 2003 se realizaron cambios (“*American Joint Committee on Cancer*”, AJCC) en la clasificación TNM del cáncer mamario dirigidos a una más completa y significativa estratificación de las pacientes atendiendo a las nuevas técnicas diagnósticas y a la introducción de la biopsia del ganglio centinela.

Los principales cambios se refieren a: 1) distinción basada en el tamaño tumoral entre micrometástasis y células tumorales aisladas, 2) empleo de identificadores de las nuevas técnicas, inmuno-histoquímicas y moleculares, utilizadas, 3) clasificación del estado ganglionar según el número de ganglios con metástasis y una nueva clasificación de las metástasis de ganglios infraclaviculares de la cadena mamaria interna y supraclaviculares. En la tabla 3 se puede observar la actual clasificación del cáncer de mama.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1*	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1*	N1	M0
IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIC	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

* T1 incluye T1 mic (microinvasión (0,1 cm).

Tabla 3. Clasificación en estadios del cáncer de mama. Modificada de Gonzáles-Palacios. [27]

Esta nueva clasificación se refiere a lo siguiente:

- **Estadio 0:**
Carcinoma in situ, sin afectación de los ganglios linfáticos regionales, sin evidencia de metástasis a distancia.
- **Estadio I:**
Tumor inferior o igual a 2 cm, sin afectación de los ganglios linfáticos regionales, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IIA:
 - Tumor inferior o igual a 2 cm, afectación ganglionar axilar no adheridos a planos profundos, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor entre 2 y 5 cm, sin afectación de ganglios linfáticos regionales, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IIB:
 - Tumor entre 2 y 5 cm, afectación ganglionar axilar, no adheridos a planos profundos y sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor de más de 5 cm, sin afectación de ganglios linfáticos regionales, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IIIA:
 - Sin evidencia de tumor primario, mazacote ganglionar o fijo a planos profundos o afectación clínica de la cadena mamaria interna en ausencia de afectación axilar, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor inferior o igual a 2 cm, afectación ganglionar axilar no adheridos a planos profundos, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor entre 2 y 5 cm, mazacote ganglionar o fijo a planos profundos o afectación clínica de la cadena mamaria interna en ausencia de afectación axilar, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor de más de 5 cm, afectación ganglionar axilar, no adheridos a planos profundos, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor de más de 5 cm, mazacote ganglionar o fijo a planos profundos o afectación clínica de la cadena mamaria interna en ausencia de afectación axilar, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IIIB:
 - Tumor que infiltra directamente la pared torácica, la piel, ambas o carcinoma inflamatorio, sin afectación de ganglios linfáticos regionales, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor que infiltra directamente la pared torácica, la piel, ambas o carcinoma inflamatorio, afectación ganglionar axilar no adheridos a planos profundos, sin evidencia de metástasis a distancia.
 - Tumor que infiltra directamente la pared torácica, la piel, ambas o carcinoma inflamatorio, mazacote ganglionar o fijo a planos profundos o afectación clínica de la cadena mamaria interna en ausencia de afectación axilar, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IIIC:

Tumor de cualquier tamaño, afectación infraclavicular, o de la arteria mamaria interna con afectación simultánea axilar, o afectación supraclavicular independiente de la afectación de la arteria mamaria interna, sin evidencia de metástasis a distancia.

- Estadio IV:

Tumor de cualquier tamaño, cualquier afectación ganglionar, con metástasis a distancia [27].

La determinación correcta del estadio en las pacientes con cáncer de mama reviste una extraordinaria importancia. No solo permite un pronóstico exacto sino que en muchos casos la toma de decisiones terapéuticas se basa en la clasificación TNM.

2.7 Tipos histológicos.

El carcinoma es más frecuente en la mama izquierda que en la derecha en una proporción de 110:100. Los cánceres son bilaterales o secuenciales en la misma mama solo en el 4% de los casos. El cáncer mamario surge del revestimiento epitelial de los conductos grandes o de tamaño intermedio (ductal) o bien de los conductos terminales de los lobulillos (lobulillar). El cáncer puede ser invasivo o in situ. Casi todos los cánceres mamaros proceden de los conductos intermedios y son invasivos (ductal invasivo o infiltrante) y la mayor parte de los tipos histopatológicos corresponde a subtipos del cáncer ductal invasivo con patrones de crecimiento diferentes.

El carcinoma ductal que no ha invadido el tejido extraductal corresponde a un tipo Intraductal o in situ. El carcinoma lobulillar puede ser invasivo o in situ. Los cánceres no invasivos por definición se confinan arriba de la membrana basal de los conductos y carecen de capacidad de diseminación. Los subtipos histopatológicos del cáncer mamario se encuentran en la tabla 4.

TIPO
Ductal Infiltrante. No especificado de otra manera: Medular * (80-90%) Coloide (mucinoso) *(5-8%) Tubular *(2-4%) Papilar *(1-2%)
Lobulillar invasivo.
No invasivo: Intraductal *(1-2%) Lobulillar in situ *(6-8%)
Cánceres raros: Juvenil (secretor) *(4-6%), Adenoideo quístico *(2-3%) Epidermoide *(2-3%).

Tabla 4. Distribución de los tipos histológicos de carcinoma de mama. Modificada Cotran et al. [4].
*Frecuencia de presentación

Carcinoma ductal in situ:

Es una proliferación de células atípicas, confinada por una membrana basal intacta al sistema ducto-lobular de la mama, no es causa de morbilidad a menos de que se convierta en invasivo. Se ha clasificado en cinco subtipos:

1. Comedocarcinoma: Se caracteriza por la presencia de un grupo sólido de células malignas de alto grado con necrosis en la parte central del cúmulo celular, con frecuencia esta zona sufre calcificación.

2. Carcinoma ductal in situ no comedón: Puede presentar grados nucleares que van desde leve a intenso. Las calcificaciones se observan en asociación con necrosis central. Las células presentan un aspecto monofórmico.

3. Carcinoma ductal in situ de tipo cribiforme: Se observan espacios intraepiteliales distribuidos al azar y con una morfología regular.

4. Carcinoma ductal in situ de tipo papilar: Carece de la capa normal de células mioepiteliales.

5. Carcinoma ductal in situ de tipo micropapilar: Se reconoce por la presencia de protrusiones epiteliales sin eje fibrovascular con frecuente formación de patrones intraductales complejos.

Representa un precursor no obligado con riesgo variable de progresión, dependiendo de la combinación de varios factores como: Patrón histológico (por extensión, grado histológico), tamaño de la lesión, estado de los márgenes, estudios complementarios y marcadores de proliferación y el c-erbB-2.

Según el sistema Van Nuys de Silverstein y Lagios el cuál se basa en la distinción de tres grados nucleares, de acuerdo con el tamaño, textura y presencia de nucléolos y la presencia o ausencia de necrosis tipo comedo.

Grupo 1: (Bajo grado) Tumores con núcleos de bajo grado o intermedio, ausencia de necrosis.

Grupo 2: (Grado intermedio) Tumores con núcleos de bajo grado o intermedio y necrosis tipo comedo.

Grupo 3: (Alto grado) Tumores con núcleos de alto grado, independientemente de la presencia o ausencia de necrosis.

El grado del tumor es un factor pronóstico significativo para el riesgo de recidiva. En el caso del carcinoma ductal in situ la medición del tamaño de la lesión se suele hacer en las placas microscópicas, pueden existir múltiples focos y pueden aparecer o no calcificaciones.

Carcinoma lobulillar in situ:

Proceso microscópico, constituye un hallazgo incidental encontrado en asociación con alguna otra alteración macroscópica o mamográfica. Este fue descrito por Foote y Stewart en 1941. Los acinos lobulillares aparecen, llenos y distendidos por una proliferación de células poco adheridas, con núcleos redondos bastante anodinos, citoplasma escaso y nucléolos poco prominentes, aunque esto puede variar ya que las características citológicas de las células pueden ser más variables por ejemplo núcleos pleomorfos y citoplasma abundante.

Para diferenciar entre carcinoma ductal in situ y carcinoma lobulillar in situ: La presencia de luces intracitoplasmáticas y glóbulos de mucina en una lesión proliferativa, que afecta la unidad conducto-lóbulo terminal, constituye la evidencia convincente del carcinoma lobulillar in situ, figura 17.

Esto se manifiesta como una proliferación de células atípicas que tapizan el conducto, con una capa de epitelio ductal intacto. En una mama atrófica de la mujer menopáusica, este patrón puede ser la única evidencia de carcinoma lobulillar in situ.

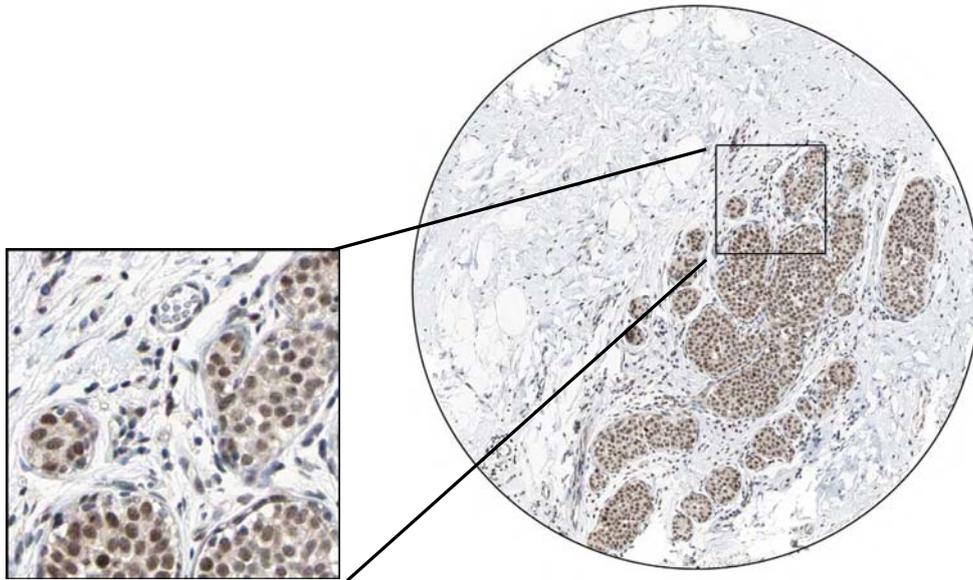


Figura 17. Carcinoma lobulillar in situ. [II].

Carcinoma de mama invasivo: La mayoría de los cánceres invasivos proceden de células de la unidad ducto-lobulillar terminal, figura 18.

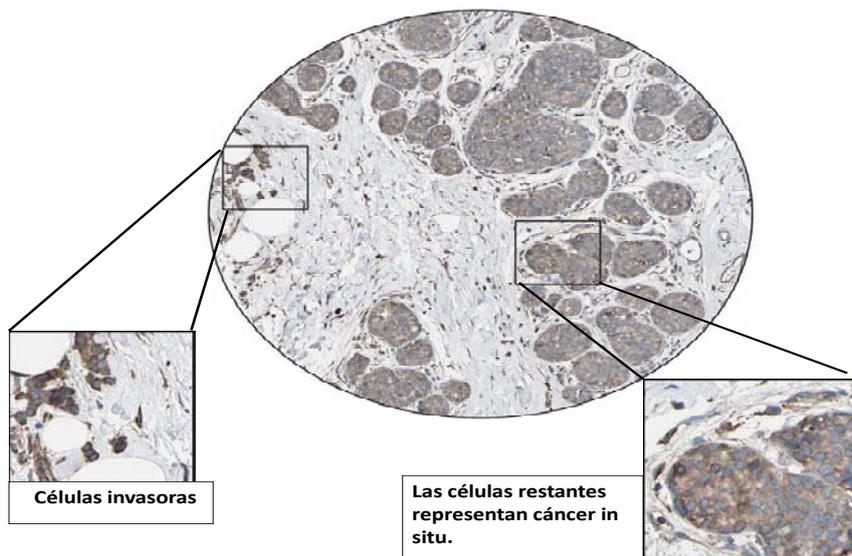


Figura 18. Carcinoma de mama invasivo. [II].

Carcinoma lobulillar infiltrante:

Representa hasta el 16% de los cánceres de mama invasivos. El tumor puede presentarse como una masa escirrosa, indistinguible macroscópica y mamográficamente del carcinoma ductal infiltrante, aunque es más insidioso el tumor lobulillar se presenta como un tumor menos definido que resulta menos aparente en la exploración física.

Descripción microscópica clásica: (Según Foote y Stewart) es un tumor infiltrante difuso, compuesto de células con núcleos redondos pequeños y con pleomorfismo mínimo y escasa actividad mitótica. Las luces intracitoplasmáticas que proporciona un aspecto de anillo de sello son frecuentes, pero no patognomónicas, puesto que también se pueden encontrar en los carcinomas ductales. Las filas lineales (“fila india”) de células tumorales infiltrantes, representan el patrón de invasión más característico como se puede observar en la figura 19, y muchas veces forman espirales alrededor de las estructuras ductales nativas, con el llamado patrón en “diana”. Existen variantes que consisten en células con las mismas características citológicas que las del tipo clásico pero con diferentes patrones de proliferación como el alveolar el sólido o el túbulo-nodular.

El tipo pleomorfo: Esta variante consiste en células que infiltran del mismo modo que las del carcinoma lobulillar clásico, pero que tiene núcleos de lato grado. Presentan un comportamiento más agresivo.

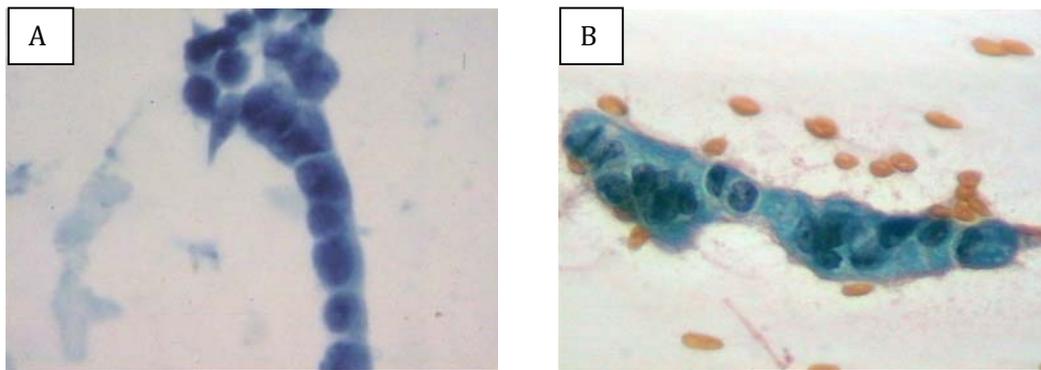


Figura 19. A y B: Carcinoma lobulillar infiltrante. Las células de mayor tamaño que los hematíes, tiende a formar hileras con sus elementos moldeándose entre sí. [III].

Carcinoma ductal infiltrante:

Este grupo de tumores incluye la mayoría de los casos de cáncer de mama de tipo invasivo (85 al 90%).

Este se divide en dos subtipos:

- a) No de tipo especial ó “no especificado de otra forma” este representa del 50 al 75% de los casos. Los núcleos varían desde pequeños y bastante anodinos, hasta los que presentan agrandamiento y pleomorfismo evidentes. La actividad mitótica puede oscilar desde mínima hasta evidente y en general es paralela al grado nuclear. Los patrones histológicos se describen a partir del grado de formación de glándulas, que puede ser muy prominente o faltar por completo. Hay que considerar si hay necrosis extensa o la presencia de carcinoma ductal in situ difuso.
- b) De tipo especial: Es un grupo de tumores diferenciados de los no de tipo especial por su aspecto histológico distintivo y comportamiento [28].

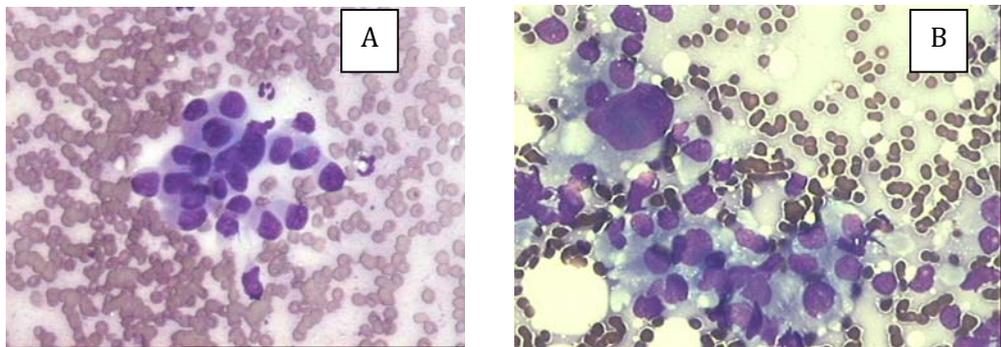


Figura 19. A y B: Grupo epitelial procedente de la punción de un carcinoma ductal infiltrante. Falta de cohesión celular. [III].

2.8 Tratamiento.

En etapas tempranas, con tratamiento multimodal, como cirugía, quimioterapia, hormonoterapia y radioterapia, se espera que la mayoría de las pacientes logren una sobrevida estimada a 5 años del 98%. Sin embargo, más de la mitad de este grupo de pacientes pueden tener una recaída de la enfermedad, que de ser localizada o diseminada modificará la sobrevida estimada en 80% y 26% a 5 años, respectivamente. Los retos que plantea esta situación son por una parte la prevención, el diagnóstico precoz y la mejor utilización de los recursos terapéuticos ante cualquier etapa o tipo de enfermedad recurrente y/ o metastásica. Es importante no perder de vista la calidad de vida y el costo-beneficio.

Tratamiento quirúrgico.

La mastectomía radical, introducida por Halsted, representó una mejora importante en el control local y regional del cáncer mamario y de acuerdo a los principios halstedianos de la diseminación tumoral que seguía un proceso ordenado y centrífugo, ocupó un lugar de privilegio en el tratamiento del cáncer mamario hasta la mitad del siglo pasado. Durante los decenios de los cincuenta y los sesenta, se comenzó a dudar si la mastectomía radical cumplía con los requisitos de la hipótesis de Halsted.

Mustakallio en 1954, y Porritt, Peters y Crile en 1960, presentaron sus resultados con la escisión local seguida con radioterapia y aunque no demostraron ventajas claras con este enfoque, sí probaron que con esta modalidad terapéutica que las pacientes podían vivir por varios años libres de enfermedad. Los procedimientos no fueron basados en conceptos biológicos claros y varias veces fueron realizados porque las pacientes se rehusaron a ser tratadas mediante mastectomía radical. En 1968, el grupo de Bernarda Fisher formuló una hipótesis alternativa, fundamentada en conceptos biológicos y no en anatómicos y mecanicistas, la cual consideró al cáncer mamario como una enfermedad sistémica en la que no existía un patrón ordenado de diseminación y donde los ganglios linfáticos eran ineficaces como barrera de diseminación de la enfermedad, lo que tuvo importancia biológica y sirvió como indicador de la relación entre el huésped y el tumor; además consideraba importante la vía hematológica en la diseminación tumoral.

Diversos nombres han sido utilizados para describir la cirugía conservadora: Tumorectomía, escisión local, tlectomía y lumpectomía, y todos se refieren a la resección del tumor mamario y suficiente tejido sano para lograr márgenes histológicos libres de tumor.

El consenso general de contraindicaciones para la conservación del seno comprende terapia radiactiva previa que involucra la región del seno, enfermedad multicéntrica o paciente en el primero o segundo trimestre del embarazo. La cirugía conservadora de la glándula mamaria es una opción válida en la mayoría de las pacientes que padecen cáncer de mama. Esta modalidad terapéutica ha demostrado una supervivencia similar con la adición de la radioterapia comparada con la cirugía convencional. Los objetivos de la cirugía conservadora son preservar las características estéticas de la mama y lograr el mismo control local de la enfermedad comparada a la mastectomía radical modificada, aunque está sigue ocupando un importante lugar como tratamiento del cáncer mamario. En nuestro país lamentablemente este tipo de cirugía no se realiza con la frecuencia deseada debido a que la mayoría de las pacientes no reúnen los requisitos para efectuarla (la mayoría de las pacientes acuden con enfermedad localmente avanzada no siendo candidatas a este tipo de cirugía) [29, 30].

Hormonoterapia para cáncer de mama.

Este tipo de tumor es hormono-sensible frecuentemente, poco menos de la mitad de las pacientes premenopáusicas, y dos tercios de las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama presentan tumores con receptores de estrógeno o progesterona. Además, la sensibilidad de los tumores malignos de la mama a los receptores de estrógeno se incrementa con la edad, por lo que el bloqueo del estímulo hormonal constituye un objetivo terapéutico importante. Las hormonas influyen tanto en el riesgo de desarrollar cáncer de mama como en su historia natural. Se ha acumulado suficiente evidencia clínica y experimental para respaldar el papel de los estrógenos en el desarrollo y crecimiento de los tumores de mama, siendo cada vez más claro su papel en la iniciación y promoción de la enfermedad neoplásica. Este concepto se basa en los siguientes puntos:

- Existe información epidemiológica que indica un efecto protector de la ooforectomía concomitante al tratamiento hormonal y el incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres tratadas con dietilestilbestrol.
- Se ha demostrado el efecto mitogénico de los estrógenos en varias líneas celulares de cáncer de mama.
- Los reportes también han demostrado que el empleo de hormonales orales en edades muy tempranas incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Todos estos resultados sugieren que los estrógenos participan en la promoción del crecimiento tumoral y, posteriormente en la progresión de la misma.

Estrógenos.

Los estrógenos ejercen efectos de promoción del crecimiento en el tejido mamario directamente a través de la inducción de enzimas y proteínas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos, y/o la activación de oncogenes, o indirectamente a través del incremento en la producción de otras proteínas reguladoras como el factor- α transformante de crecimiento, el factor de crecimiento epidérmico, los activadores de plasminógeno. Los estrógenos y las progestinas efectúan sus acciones celulares a través de la unión y activación de receptores nucleares específicos, el receptor de estrógeno (RE) y el receptor de progestina o progesterona (RPg). Estos receptores son proteínas asimétricas de distribución tisular variable, cuya función es distinguir una señal específica y transmitirla para obtener una respuesta celular adecuada. Varían de 3000 a 100,000 por célula, se unen a la cromatina mediante el complejo activado ERE (Elemento que Responde al Estrógeno), que se encuentra en la proximidad inmediata a numerosos genes y regula su transcripción [30]. Como se puede observar en la figura 20.

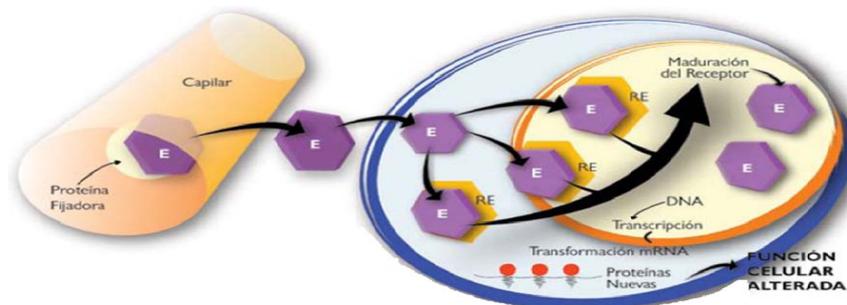


Figura 20. Complejo de enlace hormona esteroide-receptor. Modificada de Morales. [30].

La expresión de los RE y RPg como biomarcadores pronósticos se estableció y su determinación rutinaria es requerida en el manejo cotidiano del cáncer de mama, ya que además de su impacto pronóstico, la presencia o ausencia de su expresión y las combinaciones resultantes de ésta nos sugieren la posible respuesta al tratamiento hormonal pues reflejan de alguna manera el índice proliferativo de los tumores (Tabla 5).

ESTADO	PACIENTES	INDICE DE PROLIFERACIÓN
RE +, RPg +	60, 567	4.3
RE +, RPg -	26, 653	6.3
RE -, RPg +	3, 483	7.4
RE -, RPg -	15, 802	11.2

Tabla 5. Receptores de estrógeno e índice proliferativo en cáncer de mama (RE: Receptor de Estrógeno) (RPg: Receptor de Progesterona). Modificada de Morales. [30].

Para la detección de la expresión de RE o RPg en tejido tumoral se cuenta con una variedad importante de técnicas de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica. En niveles cuantitativos, se consideran positivos ambos receptores a partir de los 10 fmol por miligramo de proteína.

Los RE y RPg constituyen una superfamilia de receptores hormonales nucleares que funcionan como factores de transcripción cuando se unen a sus respectivos ligandos. Un enlace del estrógeno a su RE forma homodímeros y se une al DNA con alta afinidad a sitios específicos ERE. Para reducir el efecto del estrógeno en las células tumorales se inhibe la acción del estrógeno con agentes antiestrogénicos y la prevención de la producción de estrógenos por inhibición de la enzima de la aromatasa. En mujeres premenopáusicas, la mayor producción de estrógenos deriva de los ovarios, y en las postmenopáusicas además de los ovarios, la corteza suprarrenal secreta andrógenos, que gracias a la enzima aromatasa puede convertirlos en estrógenos en los tejidos periféricos como la grasa, la piel, el hígado, los músculos y el tejido mamario (Figura 21).

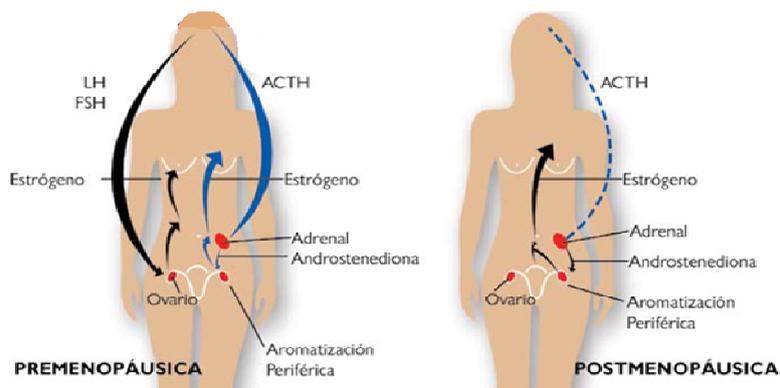


Figura 21. Producción de estrógenos en una mujer premenopáusica y postmenopáusica. Modificada de Morales. [30].

Como se mencionó con anterioridad las células cancerosas mamarias son de origen epitelial, surgen de la unidad lóbulo-ductal y según la rebasen pueden clasificarse en carcinomas in situ o invasores. El 75% de los carcinomas invasores son hormonosensibles, por lo que la hormonoterapia es una de las principales armas del tratamiento médico que se basa en el bloqueo de la acción hormonal para evitar el crecimiento celular. La terapia endocrina constituye parte esencial del tratamiento tanto en el escenario adyuvante como en la enfermedad metastásica y es determinado por la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y/o los receptores de progesterona (PRg).

BLOQUEO DE LA ACCIÓN ESTROGÉNICA

Tamoxifén, Toromifeno, otros.

BLOQUEO DE LA SÍNTESIS DE ESTRÓGENOS

Ablación ovárica: Quirúrgica, Médica (análogos LH-RH, Goserilín, Leuprolide).

INHIBICIÓN O INACTIVACIÓN DE AROMATASA

Anastrozol, Letrozol y Exemestane.

Cuadro 1. Mecanismos de acción de las terapias hormonales. Modificada de Morales. [30].

El Tamoxifén (TAM) adyuvante por 5 años es el tratamiento estándar para mujeres premenopáusicas que expresen RE y/o RPg. En las mujeres posmenopáusicas los inhibidores de aromatasa con o sin TAM son el nuevo estándar de manejo adyuvante. En las mujeres premenopáusicas y en el escenario adyuvante, la castración médica gracias a los análogos LH-RH más Tamoxifén en adición a la quimioterapia mejora el pronóstico.

Quimioterapia adyuvante en cáncer de mama: El objetivo de la quimioterapia adyuvante es eliminar enfermedad micrometastásica, que potencialmente puede estar presente en todos los casos y con ello, disminuir el riesgo de recurrencia y de incrementar la supervivencia.

Antraciclinas: Estas se han convertido en la piedra angular del tratamiento del cáncer de mama, la adriamicina, ha sido el medicamento más estudiado. La amplificación de HER2 y sensibilidad a antraciclinas está relacionada con la expresión de topoisomerasa II (TOP2A), existe evidencia en enfermedad metastásica, que esta amplificación se asocia con la sensibilidad a antraciclinas. Las antraciclinas son inhibidores de la topoisomerasa, se ha demostrado que cambios genéticos estructurales o de expresión de proteínas pueden incrementar la sensibilidad a las antraciclinas.

Taxanos secuenciales: En estudios previos se ha demostrado que incrementan la supervivencia global con una disminución del riesgo a muerte de un 18 a 23%.

Taxanos concomitantes: Se ha realizado estudios en los que evalúan la utilidad de los taxanos administrados de forma concomitante con antraciclinas, existe información suficiente que avala el uso rutinario de taxanos en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama ganglios positivos (19); sin embargo, existe la duda sobre el taxano a elegir y su mejor forma de administración.

Trastuzumab (Herceptin): Aproximadamente 15-25% de los cánceres de mama tendrán amplificación del gene HER2/ neu (ErbB2) y un exceso en la proteína HER2 en las células malignas, lo que se asocia con altos porcentajes de recurrencia. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido en contra de la proteína HER2. Se ha demostrado que cuando se administra de forma adyuvante en mujeres con cáncer de mama temprano, ya sea de manera concomitante con paclitaxel o después de quimioterapia durante 12 meses, trastuzumab disminuye el riesgo de recurrencia en 50% y el riesgo de muerte en 30% aproximadamente. En estos estudios, el principal efecto adverso fue insuficiencia cardíaca.

La elección del tratamiento adyuvante es compleja y debe ser basada en las características clínico-patológicas de la enfermedad. Se han formulado guías de tratamiento basadas en la evidencia y hasta el momento son un parte aguas para la toma de decisiones. Se recomienda adecuar la quimioterapia sistémica en base a la respuesta endócrina y a otras categorías de riesgo a continuación descritas.

De acuerdo a las categorías de riesgo y a la sensibilidad al tratamiento hormonal, para una paciente hormono-sensible con una categoría de riesgo baja se recomienda únicamente terapia endócrina, mientras que a una paciente sin respuesta endocrina y en una categoría de alto riesgo quimioterapia debe usarse quimioterapia adyuvante, tabla 6 [31].

CATEGORÍA DE RIESGO	CARACTERÍSTICAS
RIESGO BAJO	Ganglios negativos y todas las siguientes características: pT ≤ 2 cm y grado nuclear 1, ausencia de permeación tumoral vascular y HER2 negativo.
RIESGO INTERMEDIO	Ganglios negativos y al menos una de las siguientes características: pT ≥ 2 cm o grado nuclear 2-3 o presencia de permeación tumoral vascular o HER2 sobre-expresado o amplificado o edad ≤ a 35 años o ganglios positivos y HER2 negativo.
RIESGO ALTO	Ganglios positivos y HER2 sobre-expresado o amplificado o ganglios positivos ≥ 4.

Tabla 6. Categorías de riesgo. Modificada de Consenso de St Gallen. [31].

La quimioterapia adyuvante ha demostrado disminuir el riesgo a recurrencia y muerte por lo que se considera un estándar de tratamiento. La poli-quimioterapia basada en antraciclina se considera superior a CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5FU9). En ganglios positivos, la adición de taxanos concomitante o secuencial ha demostrado mejorar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. La sobre-expresión o amplificación de HER2 es un factor de mal pronóstico, sin embargo, el uso adyuvante de trastuzumab, administrado concomitante o secuencial con paclitaxel ha mejorado en 12% la supervivencia libre de enfermedad a 3 años. La búsqueda de factores pronósticos y predictivos han llevado al análisis del gene TOP2A como un predictor de supervivencia.

Radioterapia.

La cirugía conservadora seguida de radioterapia post operatoria constituye el procedimiento estándar para el manejo del cáncer de mama temprano. Su equivalencia con la mastectomía radical ha sido demostrada en ensayos con largo seguimiento.

Desde los años 70 se generalizó el uso de cirugía conservadora con radioterapia postoperatoria, constituyendo en la actualidad el procedimiento más utilizado en el tratamiento del cáncer de mama temprano, manteniéndose la mastectomía radical modificada, con o sin reconstrucción mamaria, como una alternativa para los pacientes con contraindicación de manejo conservador. El manejo conservador estándar actual del cáncer de mama temprano incluye mastectomía parcial, disección axilar o biopsia de linfonodo centinela con o sin disección, radioterapia sobre toda la mama con o sin linfonodos según etapa y sobreimpresión en lecho tumoral, según edad, bordes e invasión. La radioterapia reduce el riesgo de recurrencia local en 70%, y el riesgo de muerte en 8,1% en pacientes con axila comprometida y en 4% si la axila es negativa. Previene una muerte por cáncer por cada cuatro recurrencias locales evitada. Este efecto es igual en todas las pacientes, independiente de la edad, de las características tumorales, de las terapias sistémicas y de la época del estudio.

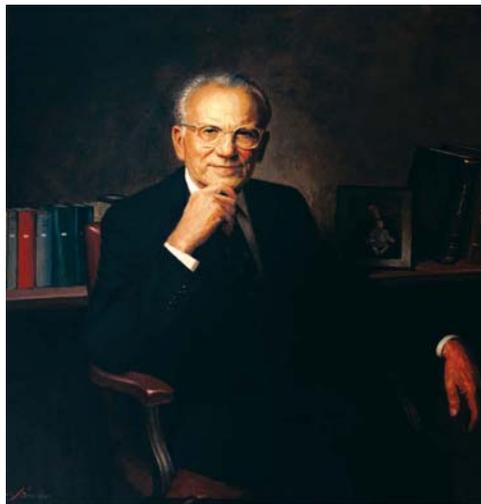
La abstención de radioterapia en el manejo conservador, se debería plantear sólo en pacientes con enfermedad de bajo riesgo y con expectativa de vida limitada por la edad extrema o por comorbilidades.

Uno de los factores esenciales para el control local es el margen quirúrgico libre. No se ha definido borde libre, pero debería ser al menos dos mm, e idealmente 10 mm. Además de la radioterapia de toda la mama, el tratamiento de los linfonodos regionales está indicado en caso de compromiso axilar. La radioterapia de fosa supraclavicular ipsilateral debe efectuarse si existen linfonodos positivos o después de quimioterapia neoadyuvante. La irradiación axilar se indica cuando existe compromiso axilar masivo. La irradiación de la mama es en general bien tolerada. Las complicaciones incluyen fatiga, edema de la mama, eritema e irritación de la piel, los que se manejan con medidas locales. Entre los efectos tardíos, relativamente infrecuentes, puede aparecer dolor local, resultado cosmético no subóptimo por fibrosis o telangiectasias. Otros efectos más infrecuentes son neumonitis actínica sintomática, pericarditis, y fracturas costales [33].

3. Genómica.

Cuando se iniciaron los estudios para determinar el mapa y la secuenciación del genoma, el objetivo primordial era analizar la estructura y la organización del genoma humano. El mapa buscaba determinar la localización general de los genes sobre los cromosomas y sus posiciones relativas uno con el otro. La secuencia de los nucleótidos en un mapa se consideró como el abordaje u objetivo final en el estudio de estos mapas.

Para concebir el significado y la importancia de esta información obtenida era necesario definir una nueva disciplina que integrará todos estos nuevos descubrimientos y es por esta razón que Mckusick fue tan importante. En los años 80's Mckusick mencionó que para el desarrollo y surgimiento de una nueva disciplina que integrará estos nuevos conceptos obtenidos a partir la secuenciación del genoma era primordial incluir el “análisis de la información obtenida” y dentro de este contexto el adoptó el término de “Genómica”. Este término nació de la unión de la Biología Celular y Molecular con la Genética Clásica y esta nueva disciplina fue además fomentada por la ciencia computacional. La Genómica entonces involucra a trabajadores competentes para construir e interpretar mapas genómicos de varios tipos, interesados además en aprender su significado biológico; para el entendimiento del desarrollo de una enfermedad [34].



Victor A. McKusick

Figura 22. Dr. Mckusick. [34].

Gracias a las ideas propuestas por McKusick se pudo englobar la enorme información generada por los estudios de secuenciación del genoma en una fundamental disciplina, la Genómica. Actualmente la Genómica la definen como una rama de la Biología que se dedica al estudio de los genomas y han surgido necesariamente subclasificaciones de ésta disciplina.

- **Genómica Estructural:** Es la rama de la Genómica orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el ADN de los genes.
- **Genómica Comparativa:** Estudia las relaciones entre genomas de diferentes especies o razas.
- **Genómica Funcional:** Se dedica a la recolección sistemática de información sobre la función de los genes, mediante la aplicación de aproximaciones experimentales globales que evalúen la función de los genes haciendo uso de la información y elementos de la Genómica Estructural. Es una nueva área de la investigación que involucra el uso de herramientas de Genética de alta capacidad de procesamiento con el análisis de transcripción de RNAm, proteínas y metabolitos, con el propósito de conocer cuál es la función Biológica de cada gen a través de su expresión, analizando cada uno de estos parámetros a una escala global.

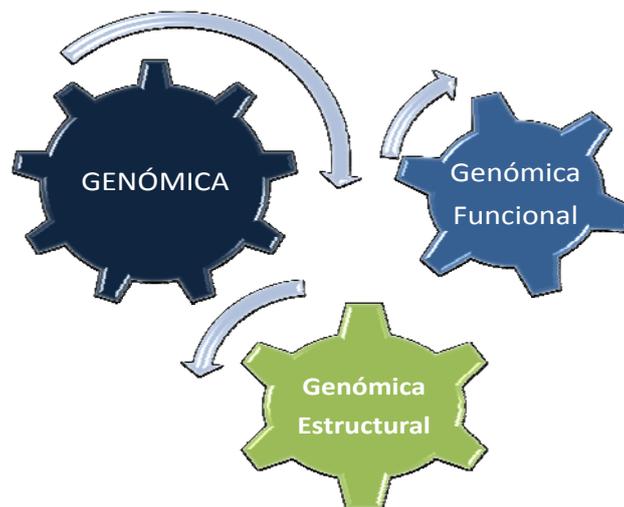


Figura 23. Subclasificaciones de la Genómica.

Las Ciencias Genómicas han tenido un importante auge en los últimos años gracias a avanzadas técnicas de secuenciación, avances en bioinformática y técnicas cada vez más sofisticadas para realizar un análisis completo de genomas. Con base a lo mencionado anteriormente se puede decir que el objetivo de la Genómica es predecir la función de los genes a partir de su secuencia [35]. Algunas de las múltiples herramientas que utiliza la Genómica para integrar la información masiva obtenida a través de éstas son la Proteómica, Transcriptómica y la Bioinformática. Los métodos que utiliza la Genómica ofrecen información acerca de la expresión de RNAm, regulación genética, expresión de proteínas e interacciones entre proteínas, por mencionar solo algunos procesos. Es decir actualmente se pueden descubrir relaciones no triviales escondidas en el código de la vida. Como podemos observar en la figura 24 la relación entre las distintas disciplinas “ómicas” es compleja, ya que el flujo de información generada a partir de la Genómica hacia la Proteómica se vuelve más complicado de abordar, y la madurez de la tecnología disponible para abordar esta información actualmente está aún en desarrollo [36].

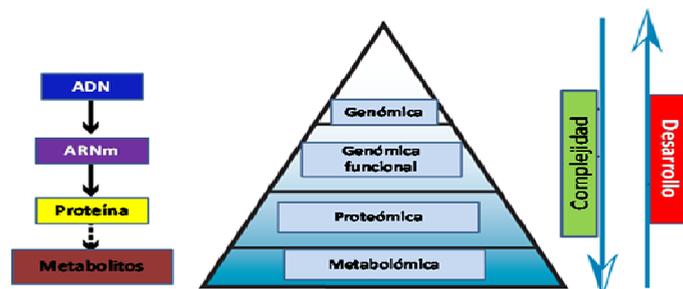


Figura 24. Relación entre las disciplinas “ómicas”. Modificada de De Hoog. [36].

Gracias a la disponibilidad actual de completar las secuencias de genomas de varios organismos eucariontes y procariontes, se han establecido nuevos desafíos en la investigación biológica para revelar los secretos de los productos de los genes, que son las “proteínas”. Actualmente es necesario conocer la función biológica de cada gen más allá del análisis de solo los genes, proteínas o metabolitos y la Genómica funcional analiza cada uno de estos parámetros en escala global con el objetivo de poder identificar y medir a los diferentes factores que puedan intervenir en un proceso biológico. De esta forma podremos comprender cuál es el significado biológico y cómo se traduce en el desarrollo de un estado patológico [37].

3.1 Genómica y cáncer.

La secuenciación completa del genoma humano ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En este contexto el desarrollo de la genómica, la Proteómica, la bioinformática y las técnicas moleculares han supuesto un impulso tecnológico determinante en la investigación del cáncer, que ya está teniendo importantes consecuencias clínicas en cuanto al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes. La disponibilidad y el buen uso de estas tecnologías deben ser un incentivo fundamental para la investigación de transferencia, gracias al esfuerzo común y continuo intercambio de información y resultados entre laboratorio y la clínica.

En este contexto tecnológico, existen diferentes formas de abordar esta patología:

- **Análisis de expresión génica:** Que se realiza mediante microarreglos que permiten determinar variaciones en los niveles de expresión de miles de genes de forma simultánea y reproducible. Los análisis de expresión mediante microarreglos de expresión constituyen actualmente una herramienta estándar para la identificación de la huella genética de las diversas formas de cáncer, permitiendo un diagnóstico preciso y una estimación del riesgo de fallo con las diversas terapias existentes. Adicionalmente, permiten identificar dianas terapéuticas potenciales y conducir a estudios experimentales basados en la firma molecular de los tumores.
- **Análisis de polimorfismos (SNPs):** La forma más común de polimorfismo es la variación de una única base en la secuencia de ADN, llamada SNP, cuya frecuencia y distribución en el genoma (1 SNP cada 1.000 bases) y su fácil manejo los han convertido en potentes herramientas para localizar genes o regiones genómicas que pudieran ser responsables de algún tipo de enfermedad o del incremento de la susceptibilidad de ciertos individuos a padecerla. También gracias a este tipo de análisis se pueden estudiar los polimorfismos de genes relacionados con diferentes procesos tumorales, tales como apoptosis, ciclo celular, reparación y metabolización entre otros. Con estos datos se han llevado a cabo amplios estudios de susceptibilidad y de interacción entre genes que han permitido la identificación de SNPs involucrados en cáncer.

- Microarreglos de tejidos: Constituyen un método sencillo de análisis de expresión que se fundamenta en la realización de “biopsias” cilíndricas de tejidos tumorales embebidos en parafina, preservando el resto del tejido para estudios futuros. Con los TMA se pueden analizar grandes series de tumores y validar los resultados obtenidos con otras técnicas como los cDNA, microarreglos de oligonucleótidos, así como de la CGH.
- Proteómica: Constituye una herramienta para el análisis proteómico en distintos tipos de muestras biológicas. Permite, por tanto, el análisis de expresión proteica diferencial en muestras tumorales frente a muestras normales. Además permite cuantificar de manera muy precisa pequeñas diferencias en la expresión de proteínas entre muestras pareadas, así como la determinación de modificaciones post-transduccionales en las proteínas asociadas a determinados estados patológicos. Otra de las aplicaciones que se le ha dado a este tipo de metodología es para la identificación de proteínas diferencialmente expresadas en líneas celulares tratadas o resistentes a diversos fármacos.
- Bioinformática: Cualquier progreso en genómica, Proteómica y otros campos biomédicos requiere un sólido apoyo de la bioinformática, ya que es necesario procesar y manejar de un modo eficiente la abundante información que estas técnicas masivas generan. Durante los últimos años se han realizado grandes avances en el desarrollo de las herramientas web para el análisis masivo de datos de expresión obtenidos con las tecnologías anteriormente mencionadas [38].

4. Proteoma.

Los genomas definen el contenido informacional de los organismos, pero no proporciona simultáneamente información sobre el funcionamiento de un organismo particular. Para esto es necesario estudiar a las proteínas [39]. Por lo que es necesario definir ¿qué es el Proteoma?

Este término fue acuñado por Wilkins en 1996 y lo definió como el complemento proteínico total expresado por un genoma. Aunque esta definición no considera aspectos o características particulares y únicas que posee el Proteoma; una de ellas es que es totalmente dinámico a diferencia del genoma de un organismo que es constante a lo largo de la vida, además es imposible hablar de un Proteoma único ya que su expresión cambia en diferentes etapas del ciclo celular pero también en respuesta a acciones externas. Presenta además una complejidad extraordinaria ya que algunos genes codifican varias proteínas y como resultado, el tamaño del Proteoma es mucho mayor que el número de genes [40].

Por lo que posteriormente se modificó la definición obteniendo así una más completa y apropiada: Es el conjunto completo de las proteínas específicas codificadas por el Genoma que son producto de la traducción de los RNAm y las diferentes variantes o modificaciones generadas por la célula después de este proceso, tanto expresadas temporalmente, como por el tipo de célula o tejido particular; se producen en un momento determinado y bajo ciertas circunstancias [41]. De esta manera ahora podemos entender que el Proteoma es totalmente dinámico, cambia con el tiempo, con el estadio de desarrollo y con las condiciones intra y extracelulares.

Estudiar el Proteoma es fundamental y necesario ya que la información de las secuencias completas de ADN no es suficiente para aclarar la función biológica que posee cada gen, definiendo el Proteoma cambiaremos el paradigma de la investigación más allá del análisis de solo los genes.

4.1 Proteínas.

Definición: Las proteínas del griego “proteios” que significa lo primero, son polímeros de condensación de aminoácidos con configuración L. Son moléculas complejas de gran peso molecular que contienen C, H, O, N y a veces S y P. Tienen gran importancia biológica pues las estructuras celulares están constituidas por ellas, las reacciones químicas que ocurren al interior de las células son catalizadas por enzimas que son de naturaleza proteica, cumplen funciones específicas muy diversas en el organismo humano y además cada proteína tiene una secuencia única de aminoácidos.

Dogma central de la biología.

Este está basado en que el ADN codifica los genes de un modo lineal estricto a través de un mediador el ARN, el cual es una plantilla para la síntesis de proteínas.

Replicación: En las células procariotas la replicación comienza en un punto definido y avanza a la misma velocidad en ambas direcciones hasta finalizar con la duplicación del material genético. En los eucariotas en fase S del ciclo celular se inicia la duplicación en distintos puntos (replicones), en ambas direcciones. Sin embargo, en cada replicón la inserción de nucleótidos es continua en la dirección 5'-3', pero en la cadena antiparalela (3'-5') se forma por segmentos pequeños (fragmentos de Okasaki) de 1 000 a 2 000 bases; este proceso complicado implica muchos complejos enzimáticos, que permiten el desenrollar el ADN, regular procesos, como las ciclinas entre otros. La replicación semiconservativa fue demostrada por Meselson y Stahl en 1958.

Transcripción: Para que la célula pueda usar las instrucciones de la información genética, ésta debe trasladarse del núcleo al citoplasma, donde las proteínas serán construidas. El ARN de tipo mensajero (ARNm) es el intermediario, que realiza esta labor. El ARNm está conformado por una cadena única que no forma doble hélice, con mucha menos estabilidad que el ADN (vida media en minutos). El proceso de transcripción es similar a la replicación del ADN, pero en la incorporación de nucleótidos se reemplaza la timina por el uracilo.

El proceso es comandado por la enzima ARN polimerasa y solamente se copian sectores que codifican genes, dependiendo del tipo celular en la cual se lleve a cabo este proceso en el tiempo. Esta fase es muy compleja y tiene varias enzimas que regulan su funcionamiento.

La existencia en los eucariotas de los exones e intrones complica aún más este proceso; ahora sabemos que pueden existir varias formas de recorte a este nivel, de tal forma que un gen conformado por diversos exones e intrones tiene formas alternativas de cortado a nivel RNAm, de tal forma que un gen puede generar más de un tipo de proteína (fenómeno de splicing).

Traducción: Para que un gen sea expresado el ARNm debe ser traducido a proteína. El problema era codificar 20 diferentes aminoácidos, contando para ello con solo 4 nucleótidos; no podía haber una correspondencia uno a uno, ni siquiera uno a dos, el número mínimo debiera ser al menos 3 nucleótidos por aminoácido (codón), pero las posibilidades de combinación eran $(4 \times 4 \times 4) 64$, de lo que se dedujo que había secuencias de codones redundantes o que existían codones sin sentido. En 1961 Nirenberg y Matthaei demostraron que un polímero sintético de bases uracilo, añadido a una mezcla de ribosomas, ARNt (ARN de transferencia), aminoácidos, ATP (como fuente de energía) y otras enzimas, daban origen a una proteína monótona de fenilalanina, confirmando que el triplete UUU generaba dicho aminoácido¹⁴, a partir de entonces comenzaron a describirse nuevos tripletes ligados a sus aminoácidos respectivos, constituyéndose finalmente en 1964 la tabla de la clave genética. El proceso de traducción es catalizado por un elemento molecular complejo: el ribosoma, el cual tiene un ARN ribosomal (RNAr) y proteínas [42, 43].

Clasificación de las proteínas:

1. **Proteínas nativas:** a) **Proteínas simples** (formadas sólo por aminoácidos). Como ejemplos tenemos a la albúmina y Globulinas. b) **Proteínas conjugadas** (tienen grupo prostético): Como ejemplos tenemos a las fosfoproteínas, hemo-proteínas y núcleo-proteínas. Las proteínas conjugadas además de su porción aminoacídica tienen un grupo de diferente naturaleza que se llama grupo prostético. c) **Proteínas derivadas** (modificadas por el hombre). Como ejemplos tenemos a las alcaliproteínas y las acidoproteínas.

Péptidos: Los oligómeros formados por la unión de aminoácido y pérdida de H₂O se llaman “péptidos”. Cuando se unen dos aminoácidos se forma un **dipéptido** que tiene 1 enlace peptídico formándose también 1 molécula de H₂O.

Cuando se unen tres aminoácidos se forman un **tripéptido** que tiene dos enlaces peptídico, y se forman también 2 moléculas de H₂O. Las unidades de aminoácido que forman los péptidos se llaman residuos. Se puede decir que los polipéptidos están caracterizados por la secuencia de sus residuos de aminoácido. Los polipéptidos son relativamente rígidos pero sin embargo suficientemente móviles para adoptar una variedad de conformaciones. Por lo tanto ellos pueden “plegarse” en muchas formas diferentes, Tabla 6. Dentro de la versatilidad de las proteínas encontramos que: Numerosas proteínas cambian su forma deliberadamente mientras realizan su función, pueden asociarse selectivamente con colaboradores (cofactores) para llevar a cabo su tarea de forma más eficiente, numerosas transformaciones postraducción afectan las propiedades de numerosas proteínas y tienen la capacidad de diversificarse en conglomerados desde simples dímeros a cientos de subunidades.

Nivel de estructura	Relacionada a:	Fuerzas de estabilización
Primaria	Aminoácido presente y secuencia de aminoácido	Enlaces covalentes (Ej.: enlaces peptídicos)
Secundaria	Arreglo de cadena polipeptídica en el espacio formando espiral llamada α -helice o láminas u hojas- β (hojas plegadas)	Enlaces de H
Terciaria	Doblez del péptido en el espacio o solución por medio de interacciones de cadenas laterales (Ej.: proteínas globulares, proteínas fibrilares)	-Puentes salinos. -Fuerzas de Vander Wals. -Enlaces de H -Uniones disulfuros, etc. (-S-S-)
Cuaternaria	Varias subunidades de una proteína se combinan para formar agregados grandes un Ej.: es la Hemoglobina formada por 4 unidades esta estructura también se define como un “ordenamiento de las cadenas de subunidades en relación mutua”	-Puentes salinos -Fuerzas Vander Wals. -Enlaces de H -Uniones disulfuro, etc. (-S-S-)

Tabla 6. Niveles de organización de las proteínas.

Las proteínas se presentan como moléculas de gran tamaño o macromoléculas, con pesos moleculares entre 6 kDa y muchos millones. Todas las proteínas de todas las especies, desde las bacterianas hasta el hombre, están formadas por los mismos 20 aminoácidos diferentes.

No polares: Hidrofóbicos	Polares: Hidrofilicos	Polares: cargados Positivamente (básicos).	Polares: cargados negativamente (ácidos)
<ul style="list-style-type: none"> • Alanina (ala-A). • Valina (val-V). • Leucina (leu-L) • Isoleucina (ile-I) • Prolina (pro-P) • Metionina (met-M) • Fenilalanina (phe-F) • Triptófano (trp-W) 	<ul style="list-style-type: none"> • Glicina (gly-G) • Serina (Ser-S) • Treonina (tre-T) • Cisteína (cys-C) • Tirosina (tyr-Y) • Asparagina (asn-N) • Glutamina (gln-Q) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lisina (lys-K) • Arginina (arg-R) • Histidina (his-H) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido aspártico (asp-D) • Ácido glutámico (glu-E)

Tabla 7. Denominación de los 20 aminoácidos encontrados en los seres vivos. Clasificados en cuatro categorías principales.

Podemos concluir que las proteínas poseen importancia fundamental en la estructura y la función de las células y del organismo como unidad. Forman parte de las moléculas estructurales celulares y contribuyen a la fuerza de tracción (como fibras de colágeno) en estructuras extracelulares, por ejemplo del tejido conectivo y los huesos. Algunas proteínas son secretadas como enzimas digestivas o anticuerpos, otras actúan como sustancias señal, por ejemplo como hormonas. Las proteínas tienen especial importancia en el metabolismo celular compuesto por todas las reacciones químicas de la célula. El especial papel que desempeñan las proteínas en el metabolismo celular se debe a que casi todas las reacciones químicas involucradas son catalizadas por enzimas y a que casi todas las enzimas conocidas son proteínas. Las enzimas pueden aparecer en solución (en el citosol o dentro de los organelos) o estar localizadas sobre las membranas, donde catalizan las reacciones que se producen en la superficie límite entre las membranas y el medio circundante [44].

4.2 Proteómica.

La Proteómica es una disciplina fundamental en la era post-genómica y trata de descubrir el grupo de proteínas que dan a las células su estructura y función. La Proteómica se dedica al estudio de los proteomas, separa, identifica y caracteriza proteínas a gran escala, define niveles de proteínas celularmente, investiga complejos de proteínas, elucida funciones, cambios metabólicos e interrelaciones, tiene que analizar un gran número de proteínas, además se encarga de la caracterización funcional de tales proteínas y sus relaciones estructurales. Comprende tanto las técnicas para el estudio en gran escala de las proteínas expresadas como las aplicaciones de estas técnicas al análisis de problemas biológicos [45].

Constituye la nueva etapa en la investigación biomédica además de incluir la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma, la Proteómica ha despertado enormes expectativas en la investigación Biomédica por su potencial en la identificación de Biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar y pronosticar enfermedades, así como la definición de nuevas dianas terapéuticas particularmente porque las diferencias entre un estado “normal” y uno patológico se traduce también a nivel molecular en cambios en los patrones de expresión de las proteínas [46].

La Proteómica se divide en subgrupos:

- a) **Proteómica descriptiva o estructural** que identifica a las proteínas expresadas por un organismo en una condición dada. Todas las proteínas expresadas en un momento y en un contexto determinado.
- b) **Proteómica comparativa** que identifica los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a cambios en las condiciones del organismo. Cuáles proteínas cambian cuando un organismo se somete a condiciones diferentes.
- c) **Proteómica Funcional** que identifica conjuntos funcionales de proteínas, es decir, grupos de proteínas que se localizan en un mismo sitio celular y que operan en mutua interacción.
- d) La Proteómica enfocada a la elaboración de un mapa molecular de una célula tiene que identificar las proteínas que forman un organelo.

Para comprender por qué la Proteómica es considerada con una de las herramientas cruciales de la Genómica tenemos que mencionar el dogma central de la genética en donde:



Este dio lugar a uno de los paradigmas de la biología molecular que prevaleció durante la segunda mitad del siglo pasado: Un gen \longrightarrow Una proteína.

Es cierto que un gen codifica una secuencia de aminoácidos pero existen dos eventos o procesos que incrementan el número de proteínas que pueden ser originadas por un gen y estar presentes en una célula en un momento determinado y por lo tanto es mucho más complejo de lo que se pensaba el estudio del Proteoma de una célula.

Uno de estos eventos es el splicing o empalme alternativo, las regiones no codificantes de un gen llamados intrones interrumpen la secuencia codificante del gen o exones, estos dan lugar al ARN y posteriormente a la proteína, entonces cuando se forma el ARN mensajero los intrones son eliminados quedando así solamente la secuencia que codifica una proteína es decir los exones pueden reordenarse de varias formas para dar lugar a más de una proteína a partir de un solo gen. El otro evento radica en que una proteína puede ser modificada durante o después de la traducción o síntesis de la proteína con la introducción de grupos sustituyentes en un proceso llamado modificación postraduccional.

Esto nos indica que cerca del 10 % aproximadamente de los genes de mamíferos codifican proteínas cuya función es modificar a otras proteínas para modular su función biológica por medio de procesos como la glicosilación, fosforilación, incorporación de lípidos, hay proteínas que participan en rutas metabólicas con el fin de degradar y eliminar a otras proteínas, otras participan en el sistema de ubiquitinación o bien las proteínas que intervienen en la proteólisis, es por esto que una secuencia única de aminoácidos puede generar muchas especies químicas diferentes [39].

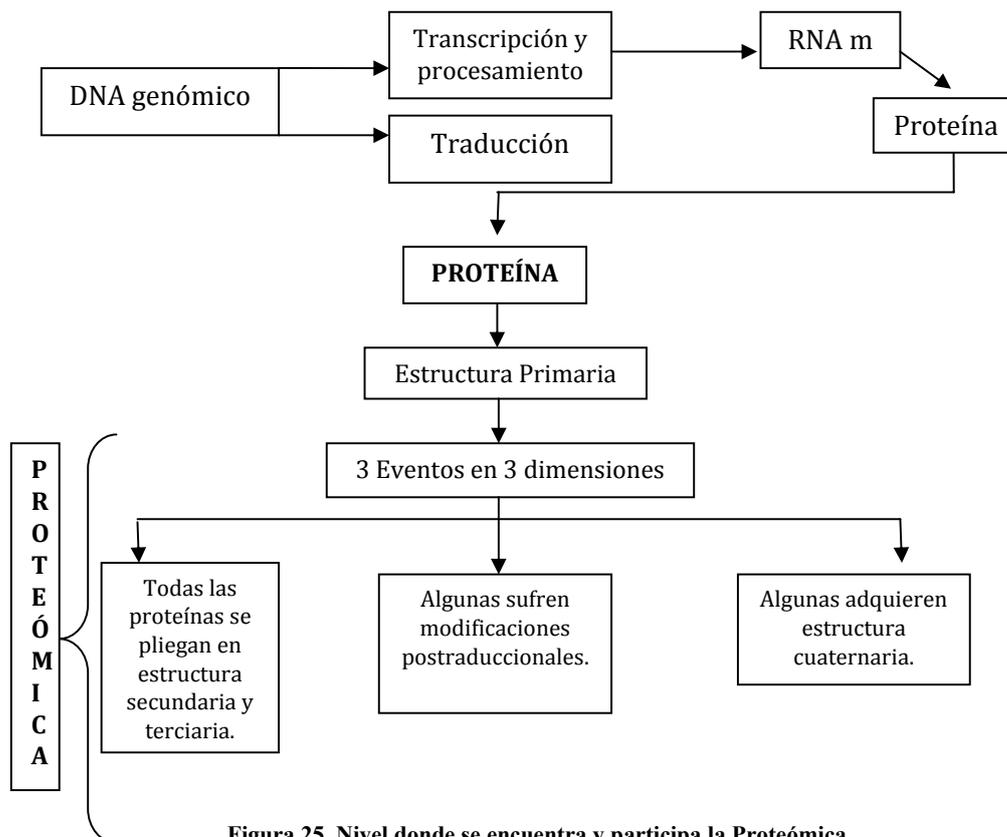


Figura 25. Nivel donde se encuentra y participa la Proteómica

Para poder investigar el Proteoma tenemos que recordar a la Proteómica comparativa, esta área se enfoca a la comparación de cambios a nivel de expresión de proteínas y si estos cambios influyen en el fenotipo de un organismo. Se podría formular el siguiente dogma de la Proteómica comparativa:

“Los cambios en un nivel superior del fenotipo de un organismo o de uno de sus componentes está relacionado con cambios en el fenotipo molecular de la expresión de proteínas”.

Concretamente la idea del uso de la Proteómica es relacionar los cambios en las propiedades biológicas con los cambios en la expresión de las proteínas. Para obtener esta relación es necesario disponer de técnicas especializadas que permitan:

- a) Separar miles de especies, identificar las especies de interés y cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de proteínas.

La Proteómica aborda todos estos problemas técnicos. Es un área emergente que integra múltiples tecnologías en continua evolución. Utiliza distintas tecnologías que permiten obtener y comparar “instantáneas” de las proteínas que se están expresando en un momento determinado en una célula, como es la electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y la bioinformática. Aunque es cierto que se necesita establecer normas internacionales de estandarización a nivel metodológico y a nivel diagnóstico para obtener resultados comparables, ya se tienen establecidos protocolos para aplicar este tipo de tecnología dependiendo del tipo de información que se quiera obtener.

En general las etapas principales de para realizar un análisis por 2DE (electroforesis de dos dimensiones) seguido de la identificación de las proteínas de interés son las siguientes [47]:

- Recolección y almacenamiento de la muestra.
- Extracción y solubilización de las proteínas.
- Separación y detección de las proteínas.
- Identificación de las proteínas de interés.
- Análisis de la identidad de la proteína.

Extracción y solubilización de las proteínas:

Las técnicas utilizadas para la extracción y la solubilización de las proteínas tienen que cumplir ciertas condiciones, la primera es que no pueden alterar el perfil de las proteínas, la segunda es que no pueden introducir modificaciones sobre las proteínas (por ejemplo que causen la proteólisis de componentes de la muestra) y por último el número de pasos debe ser mínimo para que la muestra se encuentre lista para ser incorporada al iso-electroenfoco (Primera dimensión). El objetivo de este paso es la eliminación de componentes no proteicos, sin contaminación de otros bio-componentes (lípidos, ácidos nucleicos). Los medios de extracción y solubilización contienen en general detergentes no aniónicos como el CHAPS que solubiliza a proteínas de membrana y los separa de componentes lipídicos, agentes reductores (DTT o Tributilfosfina) que reducen los puentes disulfuro y previenen la oxidación de proteínas. Los agentes caotrópicos (urea y tiourea) que eliminan interacciones entre proteínas e inducen su desnaturalización [48, 49].

Separación y detección de las proteínas: El objetivo de esta etapa es resolver las complejas mezclas de proteínas de las muestras biológicas, en esta etapa se pueden combinar diversos procedimientos Electroforéticos y Cromatográficos.

La Electroforesis Bidimensional: Es la técnica central para analizar un número grande de proteínas al mismo tiempo. Ésta técnica fue inventada por Tiselius, hace más de 50 años. En 1956, Smithies y Poulick describieron el primer gel en dos dimensiones. Los geles bidimensionales fueron introducidos y la técnica fue optimizada en el año de 1975 simultáneamente por J. Klose en Berlin y O' Farrell en los Estados Unidos. La electroforesis bidimensional permite obtener un rearrreglo o despliegue físico en dos dimensiones de las mezclas complejas de proteínas. En ésta técnica se combinan dos técnicas ortogonales y que se rigen por dos principios físicos diferentes:

La primera dimensión permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo a su punto isoeléctrico (focalización isoeléctrica). El Punto Isoeléctrico o Punto Isoiónico (pI) es aquel pH en que el aminoácido tiene una carga eléctrica neta igual a cero, por lo tanto “la concentración de la forma aniónica es igual a la concentración de la forma catiónica.”

Se dice que a ese pH el aminoácido tiene su mínima solubilidad, es característico de cada aminoácido y no se mueve en un campo eléctrico. Es decir las proteínas migran en un gradiente de pH hasta alcanzar el sitio donde carecen de carga. Existen dos técnicas para escoger: Separación en geles de anfolinas (separación en tubos) o separación en geles de immobilinas (separación en tiras de IPG).

En ambos casos, la focalización transcurre durante un período prolongado a alto voltaje y se busca la co-polimerización de los anfolitos (compuestos de bajo peso molecular que poseen carga eléctrica) con la matriz de acrilamida, creando de esta manera un gel con gradiente estable de carga. En un estudio del proteoma se considera realizar una serie de geles que cubran con una alta resolución desde pI 3 hasta pI 11, y desde masas de 2 kDa hasta masas de 500 kDa.

La segunda dimensión permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo a su peso molecular: El gel que contiene la primera separación se coloca perpendicularmente a la dirección de migración en un segundo gel, ahora en presencia de SDS. En esta etapa se obtienen patrones con unas 3,000 especies proteicas que se pueden comparar utilizando programas informáticos específicos, para detectar las alteraciones asociadas a la patología en estudio [50, 51, 52, 53].

Espectrometría de masas: La identificación y análisis de los péptidos generado se realiza mediante la espectrometría de masas ya que es la herramienta primordial empleada para este tipo de estudios. En los 80s Michael Barber y Richard Bordoli publicaron la aplicación de un método de ionización suave, llamado FAB (fast atom bombardment) al estudio de proteínas, actualmente ya no se emplea este método, pero fue de gran importancia ya que se midió por primera vez la masa molecular de los péptidos y se determinó su secuencia. En 1988 Koichi Tanaka publicó un nuevo método de ionización llamado MALDI (MALDI-TOF-MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry). En 1989, John Fenn publicó la aplicación de la ionización por Electronebulización (Electrospray Ionization, ESI) al estudio de péptidos, proteínas y otras bio-moléculas. Gracias a estos descubrimientos Fenn y Tanaka fueron premiados con el Nobel de Química en el año 2002 [54]. Este tipo de metodología genera iones de analitos grandes no volátiles (como son las proteínas y los péptidos) sin la fragmentación del analito.

El ESI puede ser acoplado con técnicas de separación cromatografía y electroforéticas en donde se produce un rápido bombardeo del átomo, este tipo de ionización es una opción para muestras de proteínas y de péptidos disueltas en una fase líquida.

Lo que ocurre en un espectrómetro de masas es que un haz de iones es separado de acuerdo a la relación masa/carga: m/z . Un espectrómetro de masas debe contar con dos elementos, el primero es la fuente de ionización que le suministra energía a la muestra que se estudia y el segundo es el analizador (un campo eléctrico, un campo magnético, de tiempo de vuelo o una combinación de ellos) donde los iones son separados de acuerdo a su m/z . Además la ionización ejercida puede fragmentar a la molécula dando lugar a iones fragmentados, estos iones son entonces característicos de un determinado compuesto químico y es posible realizar así su identificación a partir del espectro de masas.

Estos dos métodos fueron los que revolucionaron la aplicación de la espectrometría de masas a las bio-moléculas y actualmente es el método más poderoso para el análisis y la caracterización de péptidos y proteínas. Si usan en combinación se facilita la identificación de proteínas incluso las no reportadas en las bases de datos. La información obtenida mediante estos métodos es acerca de la masa molecular de cada uno de los péptidos, esta información es conocida como huella de masas de los péptidos de una proteína (peptide mass fingerprint) [55, 56, 57, IV].

4.3 Genómica y Proteómica en Cáncer de mama:

Las aplicaciones de esta Metodología pueden agruparse en dos grandes categorías y de gran interés para este trabajo de investigación en particular:

- a) **La caracterización del Proteoma** de un organismo con el propósito de identificar el mayor número de proteínas expresadas por un organismo en una condición biológica particular.
- b) **La Proteómica comparativa**, este tipo de investigación es de alto valor en las ciencias biomédicas ya que nos proporciona información a nivel molecular de los cambios causados por la acción de un agente externo, las diferencias que existen entre una línea celular normal y una tumoral, cambios producidos por algún agente infeccioso o bien en el campo de la fármaco-Proteómica describiendo el desarrollo de mecanismos de resistencia a medicamentos.

Es decir que la Proteómica y sus aplicaciones invaden a diferentes campos de investigación y cada vez se le está otorgando mucha mayor fuerza, ya que su potencial es enorme para nuestro beneficio [58].

Las enfermedades oncológicas son uno de los principales problemas de Salud Pública que enfrentamos actualmente. Dentro de estas el Cáncer de Mama ocupa uno de los primeros lugares en morbi-letalidad no solo en nuestro país sino a nivel mundial como ya se mencionó con anterioridad.

Esto ha motivado una infinidad de estudios para tratar de diagnosticar oportunamente, identificar características genético- moleculares para determinar el pronóstico y tratamiento más adecuado de acuerdo a las diferentes variedades histológicas que existen en esta neoplasia. Sin duda la Proteómica es una herramienta enorme para tratar de identificar estas variedades con mayor precisión y lograr cada vez tratamientos más efectivos y mejorar la calidad y sobrevida de estos pacientes.

Alteraciones moleculares en el cáncer de mama.

Como se mencionó con anterioridad las características que poseen las neoplasias malignas son las siguientes:

- Diferenciación/anaplasia: Cierta falta de diferenciación von anaplasia, estructura a menudo atípica.
- Velocidad de crecimiento: Errática, puede ser lenta y luego rápida, las figuras de mitosis pueden ser abundantes y anormales.
- Invasión local: Con invasión local, infiltración del tejido normal vecino, a veces pueden aparecer cohesivos y expansivos.
- Metástasis: Frecuentes, cuanto más grande e indiferenciado sea el tumor, más probables serán las metástasis.

Las alteraciones celulares que se producen en la progresión del cáncer de mama en general son las siguientes:

- Una de las primeras alteraciones detectables es la pérdida de la regulación normal del número de células, lo que da lugar a hiperplasia epitelial o adenosis esclerosante.
- También se produce inestabilidad genética en múltiples pequeñas poblaciones clonales de células (Hiperplasia atípica).
- Tras la progresión al carcinoma, se pueden identificar numerosas alteraciones celulares, como el aumento en la expresión de oncogenes (c-erb-B2, Her2/neu, INT2, c-ras, c-myc), la disminución en la expresión o función de genes de supresión tumoral (por ej. NM23, p53, RB).
- Alteraciones en la estructura celular, pérdida de la adhesión celular, aumento en la expresión de proteínas del ciclo celular, aumento en la expresión de factores carcinógenos y aumento en la expresión de proteasas.

Todas estas alteraciones se pueden observar en algunos carcinomas, pero no en todos, esto nos sugiere que el fenotipo maligno se puede deber a una acumulación de alteraciones múltiples más que a una progresión ordenada.

Los mecanismos celulares básicos involucrados en la progresión tumoral no se conocen; se sabe que algunas clonas agresivas crecen selectivamente, lo que conlleva no solo al desarrollo de metástasis, sino también a resistencia al tratamiento y en casos de enfermedad residual a recurrencia. Aunque en los últimos años se han identificado nuevos marcadores moleculares con uso potencial en pacientes con cáncer de mama, la diversidad de los sistemas utilizados en su estudio, ha complicado la extrapolación de los resultados a pruebas diagnósticas que permitan la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollo de metástasis. La función exacta de los genes que modulan la inestabilidad genética, la invasividad y el desarrollo de metástasis aún no ha sido totalmente esclarecida, y en la mayoría de los casos, todavía no se ha documentado una utilidad clínica directa.

Cáncer de mama hereditario.

La mayoría de los casos de cáncer de mama no tienen una causa identificable, pero aproximadamente del 5 al 10% son causados por mutaciones genéticas. Los genes de alta susceptibilidad a cáncer de mama (BRCA1 y BRCA2) se transmiten en forma autosómica dominante con penetrancia variable. Los individuos portadores de mutaciones en estos genes de susceptibilidad a cáncer de mama tienen un aumento significativo de riesgo a lo largo de su vida de padecer cáncer comparado con el riesgo de la población general.

El gen BRCA1 se encuentra localizado en el cromosoma 17, en el intervalo 17q12-21. Estructuralmente, BRCA1 es una fosfoproteína nuclear de 220 KDa. La región ácida carboxilo terminal se caracteriza por contener dominios de co-activación transcripcional y en donde se ha demostrado que BRCA1 es capaz de unirse a proteínas que forman parte de la maquinaria basal de transcripción como la RNA pol II y la Helicasa A. Tanto BRCA1 como BRCA2 son capaces de unirse a la proteína RAD51, estas proteínas son indispensables en los mecanismos de reparación asociados a daño sobre el rompimiento de la doble hebra de DNA (DSBR) a través del mecanismo de recombinación homóloga.

Además se ha demostrado que BRCA1 forma parte del multicomplejo que incluye a las proteínas básicas para reparación como MSH2, MSH6, MLH1, ATM y BLM.

Este complejo funciona como censor para daño al DNA. BRCA1 además es capaz de interactuar con la proteína p53 en sitios múltiples estimulando así la actividad transcripcional de esta proteína. A nivel molecular las pacientes con alteraciones en el gen BRCA1 tienen una alta frecuencia de mutaciones en p53 y menor sobre-expresión de Her2/neu.

BRCA2 está localizado en el brazo largo del cromosoma 13 en la región q12.3. Las mutaciones de BRCA2 son las causantes de cáncer en aproximadamente 35% de los casos de cáncer de mama familiares y está asociado a cáncer de mama en varones, cáncer de ovario, próstata y páncreas. BRCA2 se une a BRCA1 y a RAD 51 lo cual la involucra en mecanismos básicos de reparación. Esta proteína está involucrada en los procesos para el mantenimiento de la integridad genómica [12, 59].

Cancer de mama esporádico.

El cáncer de mama esporádico es resultado de una acumulación gradual de mutaciones adquiridas y no corregidos en los genes somáticos, sin ningún tipo de mutación germinal. La activación mutacional de oncogenes, a menudo junto con la inactivación no mutacional de los genes supresores de tumores, es probablemente un evento precoz en los tumores esporádicos, seguido además de mutaciones independientes en al menos otros cuatro o cinco genes. Los oncogenes que han reportados y que juegan un papel en la aparición de los cánceres de mama esporádicos son MYC, CCND1 (ciclina D1) y ErbB2 (HER2/neu).

En el cáncer de mama esporádico, la inactivación mutacional de los genes BRCA1 / 2 es raro, ya que requiere la inactivación de ambas copias del gen mutado o ser eliminado completamente. Sin embargo la supresión funcional no mutacional podría resultar de diversos mecanismos, como la hipermetilación del promotor del gen BRCA1 o unión de BRCA2 por EMSY. En la carcinogénesis de este tipo de tumores, por lo menos tres diferentes mecanismos específicos en la vía de progresión del tumor son reconocibles, la carcinogénesis es diferente en el carcinoma ductal vs el lobulillar, esto mismo se aplica en los carcinomas bien diferenciados vs con los poco diferenciados de tipo ductal.

Por lo tanto, diferentes vías en el cáncer de mama aparecen tempranamente en el proceso de la carcinogénesis, y en última instancia esto conduce a diferencias en las manifestaciones clínicas.

En el momento en el que el cáncer de mama se diagnostica clínicamente, las mutaciones pueden estar presentes en por lo menos de cuatro a seis genes importantes de modulación. Estos genes desempeñan un papel en el mantenimiento del equilibrio fisiológico entre la proliferación, la apoptosis y la diferenciación.

Otros genes regulan la expresión de receptores de esteroides, moléculas de adhesión celular y los factores angiogénicos, además de varias proteínas importantes para la invasión y el establecimiento de la metástasis. Se ha propuesto que el proceso de carcinogénesis es un modelo de progresión de multipasos en los que el epitelio normal evoluciona a hiperplasia, posteriormente a carcinoma in situ, después en un cáncer invasivo, lo que eventualmente puede diseminarse a través de los sistemas linfático y vascular para formar metástasis. Cada uno de estos pasos se cree que se correlacionan con una o más mutaciones distintas en los genes reguladores.

Clínicamente e histopatológicamente, varias diferencias se pueden identificar durante la progresión a la malignidad, que se mencionaron anteriormente.

En el modelo clásico de desarrollo de tumores como un proceso de pasos múltiples, una de las células epiteliales normales se convierte en una célula anormal precancerosa, y después de la expansión clonal se convierte en una lesión premaligna, un carcinoma in situ (Paso 1), a continuación, después de algún tiempo, dichas lesiones pueden llegar a ser invasivas (paso 2), a continuación, difunde y, después de eludir al sistema inmunológico, se forman las metástasis (paso 3). El resultado de estas alteraciones es la modificación de la expresión génica y funcional de los productos de los genes (expresión proteica) que son relevantes para la progresión del tumor.

La inestabilidad genómica podría resultar de eventos en los nucleótidos, en micro-satélites (pequeñas secuencias de ADN), en los genes y su totalidad o en cromosomas completos o partes de él. Esto puede ser resultado de mutaciones somáticas en los genes de reparación tales como MSH 1, MSH2 ó MSH 6.

Oncogenes: La amplificación de oncogenes se encuentra con frecuencia, pero sólo unos pocos de estos genes amplificados son cruciales en el desarrollo de cáncer de mama, por ejemplo, MYC, Int2, EMS1, CCND1 y ErbB2. Factores de crecimiento como EGF (Factor de crecimiento epidérmico), TGF β (Factor transformador de crecimiento β) e IGF-1 se han reportado como involucrados en la proliferación celular.

Se ha demostrado la participación de los receptores de membrana tipo tirosina cinasa en la progresión tumoral del cáncer de mama. Destacan los estudios realizados en la familia del EGFR/HER. HER1 es el prototipo de una familia de 4 miembros (EGFR/HER1, neu/erbB2/HER2, erbB3/HER3 y erbB4/HER4); cada uno posee afinidad por diferentes ligandos; a la fecha no se conoce el ligando de HER2, HER1 se presenta en el 30% de las neoplasias malignas; en cáncer de mama, se observa una correlación positiva entre su sobre-expresión, la pérdida de la respuesta a estrógeno y un mal pronóstico para las pacientes.

HER2, cercanamente relacionado con HER1, se encuentra amplificado en el 10-35% de las pacientes con cáncer de mama; se ha demostrado ampliamente su asociación con un mal pronóstico clínico. HER1 y HER2 se sobre-expresan en estadios tempranos del desarrollo tumoral, por lo que se han convertido en blancos terapéuticos. A la fecha están aprobados para el uso oncológico el Erbitux (cetuximab) empleado en cáncer colorectal metastásico y el Herceptin® (trastuzumab) para cáncer de mama; ambos son anticuerpos monoclonales, dirigidos contra HER1 y HER2 respectivamente; sensibilizan a las células tumorales al efecto citotóxico de la quimioterapia. Además, podrían inhibir indirectamente la angiogénesis y los procesos de invasividad y metástasis.

Genes supresores del cáncer: En el cáncer de mama esporádico, la inactivación mutacional de BRCA2 es raro, ya que requiere estar mutado en sus dos copias o se que se pierda totalmente.

El gen supresor tumoral p53, es uno de los genes mutados con más frecuencia en los cánceres humanos esporádicos. La mayoría de las mutaciones son mutaciones puntuales. La aparición de esta es un evento tardío. Mutaciones en Rb es común en muchos cánceres, incluyendo el cáncer de mama esporádico, pero probablemente se presenta como un evento tardío.

Mutaciones somáticas en el gen supresor de cáncer PTEN (phosphatase and tensin homolog) son raras. El gen CDH1 codifica para la molécula de adhesión E- cadherina. En cáncer de mama lobulillar esporádico, se afirma que CDH1 comporta como un supresor del cáncer.

Genes que regulan la apoptosis: La apoptosis o muerte celular programada es una característica de las células normales (células no neoplásico). En las células cancerosas la apoptosis es anormal o inhibida por completo. Las señales pro-y anti-apoptosis están bajo el control de varios genes, por ejemplo, Bax, Bcl2.

Receptores de Estrógeno (RE): Se sabe que los RE pueden ser de tres tipos: los comúnmente llamados clásicos: RE α y RE β , y el más recientemente descrito GPR30. Los RE α y RE β pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares; modulan la expresión génica al unirse a sus elementos de respuesta en el núcleo y además inducen respuestas rápidas. Estas últimas también pueden iniciarse por la transactivación del RE vía receptores tirosina cinasa (TK) y/o por los componentes de sus vías de señalización. Una vez activados, los RE activan a las MAPK y a algunos intermediarios de la señalización (PI3K y AMPc). La interacción entre ambos tipos de respuesta conlleva a la regulación de la activación transcripcional y la modulación de su actividad específica. Del recientemente descrito GPR30, solo se sabe que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G; que se une con alta especificidad al estrógeno y como agonista al Tamoxifeno y al ICI 182,780. Su localización subcelular se encuentra todavía en controversia (retículo endoplásmico o membrana plasmática).

Por inducción de la mitosis, los estrógenos puede promover la acumulación de de los daños en la replicación del ADN y esto en última instancia conduce a una fenotipo maligno. La sobreexpresión de RE α se ha observado en estadios tempranos del cáncer de mama.

Genes involucrados en la invasión y adhesión celular: Las células invasivas y de adhesión celular, son pasos esenciales en la diseminación metastásica de las células cancerosas. Varios genes están involucrados en este proceso, por ejemplo N-CAM, las integrinas, E-cadherina, UPA, cathepsinD, B, colagenasa-IV, CD44, NME1 y metaloproteasas.

Genes involucrados en la Angiogénesis tumoral: El crecimiento y la progresión de los tumores se acompañan por neovascularización (angiogénesis). Las células tumorales en el estroma contribuyen a un aumento de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y otros factores angiogénicos, como factor de crecimiento básico de fibroblastos y factor de crecimiento derivado de plaquetas [59, 60, 61, 62].

Entre los tipos histológicos del cáncer de mama, el carcinoma ductal infiltrante representa la forma más común y potencialmente agresiva. A pesar del progreso alcanzado actualmente en la detección temprana del cáncer y el tratamiento, incluyendo la nueva generación de terapias moleculares, es necesaria la identificación de biomarcadores multi-paramétricos capaces de discriminar entre los subtipos de cáncer y predictivos de la progresión del cáncer para alcanzar la aplicación concreta de terapias personalizadas.

La aplicación de las estrategias de la Proteómica para la detección del cáncer ocupa una posición central. La principal razón es la complejidad de la biología del cáncer, y en los resultados inconsistentes en las respuestas de las pacientes a las terapias actuales, ya que esta patología es tan heterogénea. Sin embargo, dado que la actividad transcripcional de un gen no refleja necesariamente la expresión de las proteínas celulares, su identificación y cuantificación es un paso esencial para la comprensión de los acontecimientos moleculares que conducen a la transformación maligna de las células.

De hecho, los diferentes factores de proteínas pueden estar sobre o sub-expresadas simultáneamente y pueden activar ó desactivar distintas funciones celulares. El enfoque de la Proteómica basado en la 2-DE en combinación con la secuenciación de proteínas, es una de las técnicas más prometedoras para la identificación de las proteínas relacionadas a la progresión y malignidad. Además ha proporcionado poderosas herramientas analíticas para identificar las diferencias en la expresión de los perfiles de expresión proteicos y el estudio posterior de las modificaciones pos traduccionales, convirtiendo así a las proteínas como potenciales marcadores biológicos en este tipo de patología.

El grupo de Pucci-Minafra en el 2007, compararon la expresión de los perfiles de proteínas obtenidos de biopsias de carcinomas ductales infiltrantes y sus tejidos adyacentes e identificaron 51 proteínas, de las cuales 34 se expresaron diferencialmente y fueron agrupadas en 8 categorías basadas en función de la mayor afinidad por sus principales funciones biológicas.

Grupos de proteínas:

- Del Citoesqueleto y proteínas asociadas.
- Enzimas metabólicas
- Chaperonas moleculares.
- Reguladores de la diferenciación y proliferación.
- Proteínas Redox.
- Proteínas-degradación.
- Otras proteínas.
- Proteínas séricas.

En las imágenes obtenidas de tejidos tumorales se observó una mayor complejidad que en los tejidos adyacentes; encontrando 1500 spots en el TT (Tejidos tumorales) y 1200 spots en el TA (Tejidos adyacentes).

Citoesqueleto y proteínas asociadas: En esta categoría las proteínas identificadas fueron ACTB/G (Actina citoplásmica), TPM2 (Tropomiosina β), TPM4 (Tropomiosina α) y una forma corta de ACTB/G y de TAGL2 (Transgelina-2) como ya se había reportado. β y α actina no se distinguen en el mapa ya que son altamente homólogos que difieren en sólo 4 aa. En el extremo amino-terminal. Generalmente ellos detectaron tres variantes isoeléctricas de ACTB/G en los geles teñidos con plata y curiosamente dos de estas aparecen significativamente sobre-expresadas en todos los tejidos tumorales, mientras que en uno de los tres no muestra significancia, indicando una alta variabilidad entre los perfiles proteómicos de los pacientes. Recientemente, muchos autores han sugerido la existencia de una relación entre la organización de actina y cambios en la expresión de la isoforma de actina con la habilidad de las células cancerosas para formar metástasis. Las otras 2 proteínas del Citoesqueleto son TPM4 y TPM2 que fueron identificadas en todos los tejidos tumorales, mientras que en menor cantidad o pequeñas cantidades o apenas si huellas de estas fueron observadas en su tejido adyacente. TPM4 tuvo una expresión diferencial en un nivel significativamente más elevado, mientras que el nivel de intensidad de TPM2 fue más variable entre los pacientes. TPM es una proteína estructural importante asociada con los microfilamentos de actina. Múltiples isoformas de TPM han sido reportadas o encontradas en líneas celulares, incluyendo células de cáncer de mama y algunos de ellos se ha pensado que están asociados con el potencial metastásico en tumores primarios. Otra proteína interesante y sobre expresada significativamente en las muestras de tejidos tumorales fue la transgelina-2 (TAGL2). Recientemente la sobreexpresión de la TAGL2 fue reportada en un gran porcentaje (69%) de hepatocarcinomas.

Enzimas metabólicas: En ésta categoría de proteínas identificaron 5 enzimas de la vía glucolítica: ALDOA (Aldolasa clase 1), TPIS (Triofosfato isomerasa), G3P2 (Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa), PGK1 (fosfoglicerato cinasa 1) y ENOA (α enolasa). Estas se encontraron colectivamente sobre-expresadas en los tejidos tumorales vs tejido adyacente. Esta observación parece de particular interés cuando se considera el cambio anaeróbico del metabolismo de las células cancerosas. Por otra parte estos datos confirman en reportes previos, indicando un incremento o aumento en los niveles de expresión de enzimas glucolíticas en células tumorales de mama vs tejido adyacente no tumoral.

También es probable que el aumento en los niveles de expresión de algunas enzimas glucolíticas pueden estar relacionados con las funciones ejercidas por las células, un ejemplo G3P2, además de su papel central en la vía glucolítica y en la producción de energía, cumple con múltiples funciones como la fusión de la membrana, agrupación de los microtúbulos, actividad de fosfo-transferasa, unión a ácidos nucleicos, todos los aspectos que merecen atención desde el punto de vista de transformación.

Chaperonas moleculares: Identificaron solo 2 proteínas en esta categoría: CRTC (calreticulina) y PPIA (peptidil-prolil cis-trans isomerasa A). Ambas se encontraron significativamente sobre-expresadas en los tejidos tumorales vs tejidos adyacentes haciendo hincapié en la hipótesis que tienen una función en el cáncer. CRTC se ha visto que se encuentra sobre-expresada en cáncer de mama. Recientemente, también se ha demostrado que calreticulina tiene un papel en la regulación de la función de p53 al afectar su tasa o rango de degradación y localización nuclear del mismo modo. PPIA se encuentra asociado con el crecimiento de las células en el cáncer de colon.

Reguladores de la proliferación y diferenciación: Identificaron 4 proteínas en esta categoría: RABP2 (proteínas 2 de unión a ácido retinoico), SH3L1 (proteína de dominio de unión SH3 parecido a ácido glutámico), 1433Z (proteína Z delta 1433) y GDIR (inhibidor 1 de disociación GDP Rho). RABP2 es una proteína de unión a retinoides, que se cree que regula el acceso del ácido retinoico a los receptores nucleares del ácido retinoico y por lo tanto participa en regular un mecanismo de retroalimentación para controlar la acción del ácido retinoico en la diferenciación celular.

Esta proteína fue encontrada entre las más variables dentro de los tejidos tumorales, esto es un resultado que sugiere que su sobre-expresión, cuando está presente puede ser utilizado para discriminar entre los subtipos de carcinomas ductales infiltrantes.

La familia de 1433Z expone diversas actividades biológicas y pueden estar implicadas en regular la división celular, diferenciación, apoptosis y cáncer. Cabe mencionar que una de las dos formas isoeléctricas se encontró significativamente sobre expresada en las muestras de tejidos tumorales, mientras que la otra es más variable.

Del mismo modo, los niveles de expresión de SH3L1 un producto del gen perteneciente a la familia SH3BGR (proteína de dominio de unión SH3 parecido a ácido glutámico) familia relacionada estructuralmente a la tiorredoxina (Trx), resultó ser bastante variable.

Por el contrario GDIR fue encontrado significativamente sobre expresado en TA vs TA.

Proteínas Redox: Estas están relacionadas con enzimas que toman un papel importante en el catabolismo celular y la protección contra el estrés metabólico. De hecho, la evidencia experimental sugiere que el estrés oxidativo interviene en varias respuestas celulares y que a su vez el control de la reducción/oxidación (redox) es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de todo el organismo. El grupo que incluye a las siguientes enzimas: SODC (Superóxido dismutasa Cu-Zn), SODM (Superóxido dismutasa Mn), THIO (Tiorredoxina), PRDX1 (Peroxirredoxina 1) y GSTP1 (Glutación-S-transferasa P).

Las cuales fueron sobre expresadas colectivamente en todos los tejidos tumorales. Actualmente, existe mucho interés en la tiorredoxina y los sistemas de glutación debido a su importante papel como sistemas redox en células animales y su probable papel como blancos terapéuticos para el cáncer. En años recientes el sistema peroxirredoxina también ha recibido mucha atención por su alta eficacia anti oxidante. En los mamíferos seis miembros de la familia de los genes Prdx han sido localizados tanto en el citoplasma como en diferentes localizaciones subcelulares, incluyendo peroxisomas y mitocondria. Algunos de los miembros de Prdx también tienen efectos en la diferenciación celular y la apoptosis y se han encontrado sobre expresados en cáncer de mama.

Proteínas de degradación: La maquinaria de las proteínas de degradación juega un papel importante en la homeostasis de las proteínas y la salud celular. Dentro de esta categoría encontraron 3 enzimas significativamente sobre-expresadas en los tejidos tumorales: CATD: Catepsina D es una proteasa lisosomal involucrada en el catabolismo de las proteínas, juega un papel importante en el procesamiento antigénico, enfermedades degenerativas y en la progresión de cáncer. En el cáncer de mama está asociada a un > riesgo de recaída y metástasis. UBIQ (Ubiquitina) y PSA5 (Proteosoma subunidad α tipo 5).

Estos resultados muestran que esta constante sobre- expresión en los tejidos tumorales vs TA añaden significado a al hecho de el valor clínico de la Catepsina D como un marcador pronóstico en cáncer de mama, cuando se utilizan ensayos bien estandarizados. De igual forma estos datos confirman que UBIQ y PSA5 son fiables candidatos como marcadores de carcinomas en mama. De hecho la vía de ubiquitina-proteosoma está implicada en la degradación de muchas proteínas celulares reguladoras y de proteínas desnaturalizadas, regulando de este modo diferentes procesos celulares incluyendo apoptosis, proliferación, diferenciación y respuesta al estrés. Por lo tanto no es de sorprenderse que la patogénesis de diversas enfermedades malignas y otros trastornos, en diferentes grados estén relacionados con alteraciones en este sistema [63].

En otro estudio realizado por Shulz et al. en el 2009, en el que estudiaron los perfiles de expresión proteicos encontraron también una expresión diferencial en las enzimas glucolíticas (MDH2 (malato deshidrogenasa mitocondrial), PGK1 (fosfoglicerato cinasa 1), TKT (trancetolasa), Aldolasa 1), citoqueratinas (CK7, 8, 9, 14, 17, 19), proteínas estructurales (vimentina, fibronectina , L-plastina), proteínas de la familia de las Anexinas y otras proteínas como NME (proteína NME 1), PRX1 (peroxirredoxina), ETF (flavoproteína) y LF (lactoferrina) [64]. En el 2008 Sanders et al. identificaron la sub-expresión en tejidos tumorales de la ubiquitina y a la proteína S1008 comparada con la expresión en tejidos no afectados, por el contrario encontraron a la proteínas S100-A6 obre-expresada en los tejidos tumorales [65, 66].

De igual forma se han identificado proteínas expresadas diferencialmente en líneas células como MCF-10A (células normales de mama), MCF-7 (Células de cancer de mama no invasivo) y MDA-MB 231 (células de cáncer de mama invasivo) por estudios de Proteómica y se han reportado las siguientes proteínas con importantes diferencias: el grupo de las Anexinas, actinas, ubiquitina, peroxirredoxinas, calrreticulina, trangelina-3, la familia de las proteínas S100 y la teorredoxina [67].

5. Justificación.

Aunque se conocen algunos genes y proteínas asociados con el desarrollo del cáncer mamario con predisposición hereditaria; los estudios moleculares a nivel génico así como la expresión de diversas proteínas en el cáncer de mama de aparición esporádica ha sido poco esclarecido; de ahí la importancia en identificar las alteraciones génicas ó proteícas que sufren las células tumorales con respecto al tejido mamario sano; que sirvan como herramientas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento en los estadios tempranos de la enfermedad.

6. Hipótesis.

Si existen diferencias en los perfiles de expresión proteicos por estudios de Proteómica entre tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado, en mujeres mexicanas con cáncer de mama en estadios clínicos II y III.

7. Objetivos.

7.1 Objetivo general.

Determinar los perfiles de expresión proteicos mediante estudios de Proteómica de tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado, en mujeres mexicanas con Cáncer de Mama en estadios clínicos II y III.

7.2 Objetivos particulares.

- Estandarizar la metodología requerida para determinar los perfiles proteicos en tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado.
- Analizar y comparar los perfiles proteicos con las características clínico-patológicas de los tumores y sus tejidos adyacentes estudiados.
- Analizar la información obtenida para la identificación de las diferencias en la expresión de las proteínas.

8. Metodología.

8.1 Selección de los pacientes.

- Se analizaron 9 muestras de tumores mamarios esporádicos, vírgenes a tratamiento (Específicamente sin Radioterapia y/o Quimioterapia previa a la toma de la muestra), con diagnóstico histopatológico confirmado con estadios II o III asociados a Cáncer de Mama.
 - Para todas las muestras, solamente se estudiaron pacientes mexicanas con padres y abuelos nacidos en México, premenopáusicas, con edad >30 años, sin antecedentes familiares de cáncer de mama y/o cualquier otro tipo de Cáncer y vistas por primera vez en el Hospital de Oncología, CMNSXXI, IMSS.
- Como control se utilizaron 9 muestras de tejidos adyacentes no afectados.

8.2 Obtención de las muestras.

- Las muestras de tejido fresco se obtuvieron por medio de biopsia abierta, bajo anestesia local de la cual se tomó aproximadamente 1g. de tejido afectado y 1 g. aproximadamente de tejido adyacente al tumor (5 cm. adyacente al tumor) los cuales se colocaron en un criotubo. El traslado de los tejidos frescos se realizó en un contenedor de nitrógeno líquido y se creó un banco de tejidos con las muestras obtenidas. Las muestras se almacenaron en un ultra-congelador a -70°C.

8.3 Extracción y solubilización de las proteínas totales.

Extracción fenólica de proteínas totales a partir de tejido fresco:

En esta metodología se realizó la extracción de proteínas totales, siguiendo el protocolo del Dr. Sergio Encarnación Guevara en el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM., *et al.* [68].

1. La muestra se congeló en nitrógeno líquido y fue colocada en un tubo de 1.5 mL.
2. Se agregó a la muestra PBS filtrado (200 a 500 μ L) e inhibidores de proteasas (50 μ L) para eliminar contaminantes.
3. Se centrifugó a 14 rpm x 5 minutos a 4°C.
4. Se retiró el sobrenadante.
5. Después se maceraron las muestras en un mortero hasta pulverizarlos, agregamos nitrógeno líquido para mantener la muestra en frío.
6. Se colocó posteriormente la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregamos 5 volúmenes de $\text{CH}_3(\text{CO})$ al 100% (1mL) y se dejó reposando toda la noche a -20°C.
7. Posteriormente centrifugamos la muestra a 13, 000 rpm a 4°C durante 10min.
8. Decantamos la acetona.
9. Agregamos 500 μ L de buffer de extracción y agitamos la muestra en un vortex por 2 minutos.
10. Agregamos a la muestra 500 μ L de $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ saturado y agitamos en vortex durante 2 minutos.
11. Dejamos las muestras reposando a -20 °C por 20 minutos.
12. Posteriormente centrifugamos a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se recuperó la fase fenólica (parte superior, sin tocar las fase blanca) y la colocamos en tubos eppendorf de 1.5 mL nuevos.
13. Si era necesario repetimos los pasos 10, 11 y 12 para recuperar más muestra.
14. Agregamos 1 mL de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y dejamos la muestra reposar toda la noche a -20°C.
15. Centrifugamos a 7,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

16. Decantamos el sobrenadante y lavamos 2 veces con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (500 μL). Centrifugamos por cada lavado a 14, 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Decantamos el sobrenadante.
17. El último lavado fue con acetona al 80% (500 μL) y centrifugar a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
18. Decantamos y dejamos evaporar la $\text{CH}_3(\text{CO})$.
19. Solubilizamos el botón con el buffer de solubilización (50-500 μL) dependiendo del tamaño del pellet, disgregando el pellet hasta que quedará transparente.
20. Centrifugamos a 14, 000 rpm a 4°C durante 30 minutos, y recuperamos el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo.
21. Los extractos se almacenaron -70°C .

8.4 Cuantificación de proteínas.

Método de Bradford: Este método se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. Es un ensayo proteico colorimétrico, está basado en el cambio de la absorbancia en el colorante Coomassie, el reactivo es rojo previamente y cambia a una forma más estable cuando se une a la proteína dando un color azul. La cantidad presente en la disolución es una medida para la concentración de la proteína por medio de la lectura de la absorbancia. La forma del colorante tiene un máximo de espectro de absorción de 595nm. El aumento de la absorbancia es proporcional a la cantidad del colorante unido a la proteína y así la concentración de proteína presente en la muestra [69].

Procedimiento:

- Preparación del reactivo de Bradford: Mezclar 10 mg de Coomassie Blue G-250 con 10 ml de fosfórico al 88% y 4.7 mL de etanol absoluto. Añadir H_2O hasta 100 mL. Filtrar a través de papel de filtro y guardar en la oscuridad.
- Realizamos una curva para cuantificar las proteínas, donde se mezclan ASB, H_2O y el reactivo de Bradford de la siguiente manera, tabla 8.

[ASB 1 µg/µl]	H ₂ O (µl)	Reactivo de Bradford (µl)
0	800	200
2	800	200
4	800	200
8	800	200
16	800	200

TABLA 8. Curva de ASB.

- Preparación de las muestras: Mezclamos 3 µl de cada muestra con 800 µl de H₂O y 200 µl de reactivo de Bradford.
- Las mezclas correspondientes a la curva de ASB y las muestras fueron vertidas en celdas de vidrio y se dejaron incubando 5 minutos a TA y se leyeron las Absorbancias a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro.

Métodos de Calibración:

A continuación se muestra la curva de ASB obtenida, tabla 17 y figura 28.

ASB (µg/ µl)	Absorbancias	Proteína (µg/ µl)
0	0	0
2	0.152	2.136039
4	0.267	4.765362
8	0.465	9.292369
16	0.721	15.145297

Tabla 17. Curva de ASB obtenida:

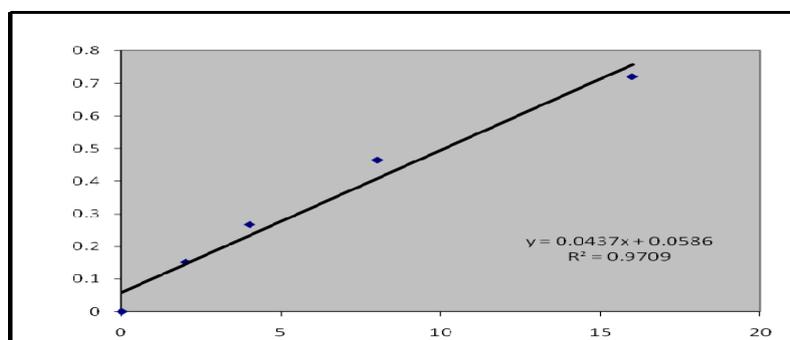


Figura 28. Curva de ASB. X: [ASB µg] Y: ABS (Absorbancias).

8.5 Geles de acrilamida – bisacrilamida SDS-PAGE al 12 %.

Para verificar las concentraciones de los extractos de proteínas totales a partir de tejido fresco se prepararon los reactivos y se elaboraron geles de acrilamida-bis acrilamida al 12 %, siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se ensamblaron y montaron los cartuchos con los cristales sobre la cámara de electroforesis y se preparó el gel separador al 12 %, tabla 9.
- Se depositó la solución del gel separador entre los cristales.
- Inmediatamente se agregó H₂O-SDS (20mL de H₂O con 0.5 mL de SDS 10%) para que el gel separador polimerizara horizontalmente y sin burbujas y se dejó polimerizar durante 20 minutos.
- Se preparó el gel compactador al 4%, tabla 10.
- Se extrajo el H₂O-SDS con un papel filtro del gel separador ya polimerizado.
- Se agregó la solución del gel compactador y se colocaron los peines, cuidando que no se formaran burbujas. Después se agregó el resto de la solución del gel compactador a lo largo de los peines con una pipeta Pasteur y se dejó polimerizar por 20 minutos.
- Una vez polimerizados los geles (separador y concentrador) se desmontaron las placas con los geles y se colocaron en el soporte con los electrodos (cassette de corrida) y se retiraron los peines en sentido vertical. Se vertió el buffer de corrida dentro del cassette.
- Se prepararon las muestras de la siguiente manera:
 - **Preparación de los marcadores de masa molecular:** Se tomaron 2.5 µl de marcador y se le adicionaron 2.5 µl y de buffer de muestra. Se hirvieron durante 10 segundos y se cargó un pozo con los 5 µl. **Preparación de las muestras:** Una vez determinada la concentración y el volumen de proteína a cargar (5 a 10 µl de muestra), se agregó un volumen igual del buffer de muestra, se mezclaron y se hirvieron por 1 minuto. Se cargaron los marcadores y las muestras.
- Los geles se corrieron a 120 V por 60 minutos. Posteriormente se procedió al desarmado del cassette de corrida y los geles fueron separados para su tinción con azul de coomassie.

Soluciones para electroforesis:

- ✓ Amortiguador Tris-HCl: Tris- HCl pH 6.8 [1M].
 - Tris base: 6.056g/50 mL H₂O_d (disolver en 30 mL de H₂O_d y ajustar el pH con HCl 1N ó 5N).
- ✓ Amortiguador Tris- HCl: Tris- HCl pH 8.8 [1.5M].
 - Tris base: 18.17 g/ 100 mL H₂O_d (disolver en 80 mL de H₂O_d en 80 mL de H₂O_d. Ajustar el pH con NaOH).
- ✓ Amortiguador de corrida: (5x pH 8.3)
 - Tris- base : 15 g/1L
 - Glicina: 72 g/ 1L
 - SDS: 5g/ 1L
- ✓ Amortiguador de muestra:
 - Tris-HCl (pH 6.8) [1M]: 1.5 mL
 - Glicerol: 3.0 mL
 - SDS 10 % : 5.0 mL
 - β- mercaptoetanol anhidro: 0.5 mL
 - Azul de bromofenol: Trazas
- ✓ Acrilamida 30%:
 - Acrilamida: 29.2g / 100 mL H₂O_d
 - Bis-acrilamida: 0.8 g/ 100 mL H₂O_d
 - Filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad.
- ✓ PSA 10 %: 0.1 g PSA + 100 µl de H₂O.

GEL SEPARADOR al 12 % (Volumen final 10 mL)	
Acrilamida al 30%	4.0 mL
Tris- HCl [1.5] pH 8.8	2.5 mL
H₂O	3.3 mL
SDS 10%	100 µl
PSA 10%	100 µl
TEMED *	5 µl

Tabla 9. Gel separador al 12 %.

GEL CONCENTRADOR al 4 % (Volumen final 10 mL)	
Acrilamida al 30%	1.66 mL
Tris- HCl [0.1M] pH 6.8	1.26 mL
H₂O	7.0 mL
SDS 10%	100 µl
PSA 10%	100 µl
TEMED *	10 µl

Tabla 10. Gel concentrador al 4%.

***Al agregar el TEMED se tienen 5 minutos antes de que polimerice y gelifiquen los 10 mL finales.**

8.6 Tinción de los geles (SDS-PAGE) con azul de Coomassie:

Para la tinción de los geles con el Coomassie seguimos el siguiente procedimiento:

- ✓ Se fijaron las proteínas en los geles con una solución de ACOOH - MeOH por 1 hora en agitación: solución fijadora a volumen final 500 mL: 50% MeOH (250 mL) + 10% ACOH (10 mL) + 40 % H₂O Mili Q (200 mL).
- ✓ Los excesos de la solución fijadora se eliminaron con H₂O Mili Q 3 veces por 20 segundos en agitación.
- ✓ Posteriormente se agregó la disolución de azul de coomassie, y se dejaron los geles en agitación toda la noche: 40 % MeOH + 10 % ACOH + Azul de Coomassie al 0.1 %.
- ✓ Por último los excesos de la solución de azul de coomassie se eliminaron con una solución al 7.5% de ACOH y 40% MeOH durante 1 hr., tabla 13. Si era necesario se cambió la solución desteñidora en varias ocasiones: solución desteñidora volumen final 500 mL: 40% MeOH (200 mL) + 7.5 % ACOH (37.5 mL) + 52.2 H₂O Mili Q (262.5 mL).

8.7 Electroforesis bidimensional (2-D).

Primera dimensión.

Después de verificar la concentración de los extractos de proteínas de cada muestra con geles SDS-PAGE, se procedió a la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, esta fue realizada con geles de anfolinas, utilizando capilares de vidrio (1mm de diámetro).

Pre-enfoque y primera dimensión. Figura 26.

Antes de preparar los geles de anfolinas fue necesario lavar los capilares de vidrio un día antes con mezcla crómica. Posteriormente fueron lavados con abundante H₂O mili Q.

- Preparación de la alícuota de acrilamida con las anfolitas: En un tubo, agregamos 7 ml de acrilamida / bisacrilamida, 434 µl de anfolitas pH 3-10 y 49.5 µl de PSA 1 %.
- Mientras tanto en un cilindro se prepara con 1 L de H₂O mili Q.
- En los orificios del embudo se agregaron 1 o 2 gotas de isopropanol, para romper la tensión superficial del agua.
- Posteriormente colocamos los capilares dentro del embudo y rápidamente los colocamos en el tubo que contenía la alícuota de acrilamida con las anfolitas.
- Posteriormente sumergimos lentamente el embudo dentro del cilindro con H₂O mili Q, cuidando que se formaran las dos fases acuosas (la primera de acrilamida y la segunda de H₂O mili Q).
- Dejamos polimerizando las tiras 1 hr.
- Los capilares se colocaron dentro de la cámara para correr la primera dimensión, en la parte inferior de la cámara se agregó la solución del H₃PO₄ (1.4 mL de H₃PO₄ + 2L H₂O mili Q) y en la parte superior de la cámara agregamos la solución de NaOH (4g NaOH + 1L H₂O mili Q). Con una aguja se depositó el buffer de cubierta (0.1925 g DTT + trazas de azul de bromofenol diluidos en 25 mL de H₂O mili Q)
- El pre-enfoque se realizó a 2,500 V por 45 minutos. Posteriormente se cargó la muestra (100µg) con una micropipeta y se corrieron 23,000 V/h.

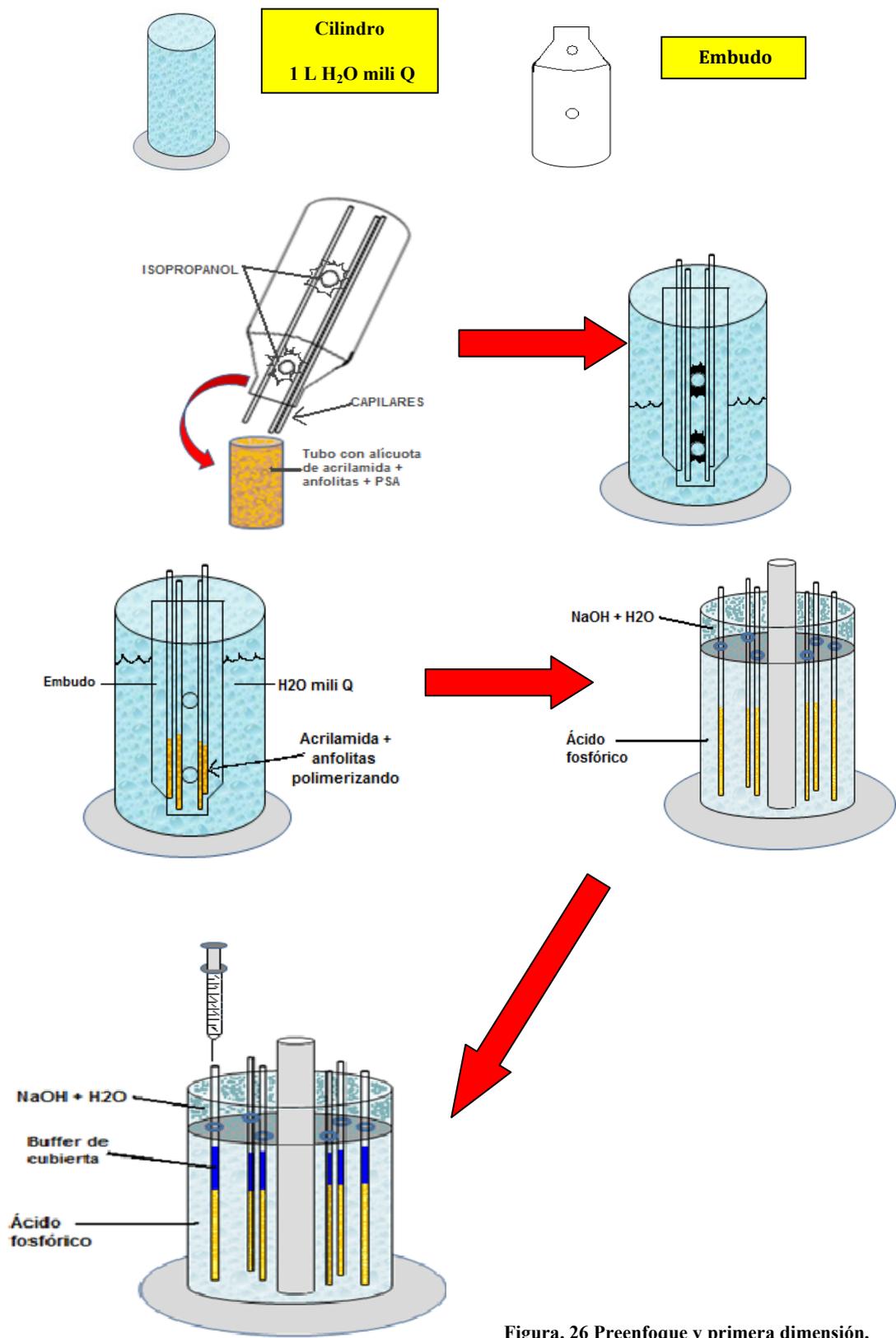


Figura. 26 Preenfoque y primera dimensión.

Segunda dimensión. Figura 27.

Una vez terminada la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, se preparó la cámara para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular, se elaboraron geles de poliacrilamida para un formato de 22 x 22 cm. realizando el siguiente procedimiento:

- Los restos de contaminantes presentes en los vidrios y los separadores se eliminaron agregando mezcla crómica (1 día de anticipación), esta mezcla se eliminó posteriormente con H₂O corriente y al final con abundante H₂O mili Q.
- Los vidrios se montaron, cuidando que mantuvieran el bisel con el siguiente orden: el primer vidrio con el bisel hacia adentro, el segundo vidrio con dos biseles y el tercer vidrio con el bisel hacia adentro. Se ajustaron y alinearon los tres vidrios con los separadores y se ajustaron con pegamento Pritt., este procedimiento se repitió 2 veces más de tal forma que quedaron 3 juegos de vidrios montados.
- Posteriormente los 3 juegos de vidrios armados se colocaron dentro del caster y se alinearon, el caster se colocó verticalmente en una superficie plana para nivelarlo.
- En un tripie se coloca un recipiente en donde se depositó la solución de acrilamida (tabla 14), en la base del recipiente se encuentra una abertura, donde se colocó una manguera y ésta se conectó al caster. Se colocó una pinza en la manguera para controlar el flujo de la acrilamida. Se abrió la pinza hasta que se llenaron los espacios entre los vidrios del caster.
- Una vez que la acrilamida llenó los espacios entre los vidrios, se agregó isopropanol en la superficie superior de los vidrios para aplanar los geles y eliminar la formación de burbujas.
- Los geles se dejaron en reposo para que polimerizarán, por 1 hr.
- Posteriormente se retiraron las tiras de acrilamida de la cámara de la primera dimensión y se colocaron a -20 °C por 10 minutos.
- Se prepararon pequeñas charolas de acrílico conteniendo 3 mL de amortiguador de equilibrio.

- Después a los capilares se les colocó un pequeño adaptador que se ajustó a una jeringa con H₂O mili Q, para expulsar las tiras de gel contenidas en los capilares, ejerciendo lentamente una presión constante.
- Las tiras se colocaron dentro de las charolas con el amortiguador de equilibrio durante 1 minuto.
- Se cambió el amortiguador de equilibrio y se depositaron 3 mL de buffer de equilibrio limpio y las tiras se dejaron en reposo durante 5 minutos dentro de las charolas.
- Los geles polimerizados se desmontaron del caster y se colocaron en una base para poder depositar las tiras de gel.
- Después las tiras de gel se colocaron dentro de los biseles de los vidrios con los geles de acrilamida polimerizados agregando agarosa al 1% previamente calentada para sellar los espacios entre los vidrios y fijar las tiras de gel.

Reactivos	(mL)
Bis-acrilamida 30.8%	196.4
Tris HCl 1M pH 8.8	121.5
H₂O mili Q	168.0
PSA 10% *	2.7
SDS 10%	10.8
TEMED *	0.35

Tabla 14. Solución de acrilamida. Volumen final 500 mL

*** Agregar al final, ya que los vidrios para polimerizar estén montados.**

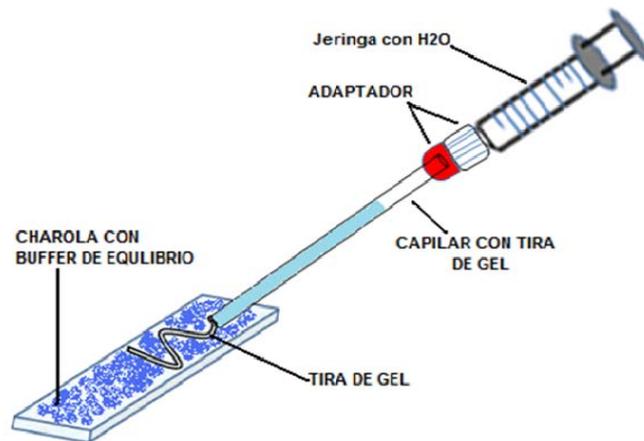
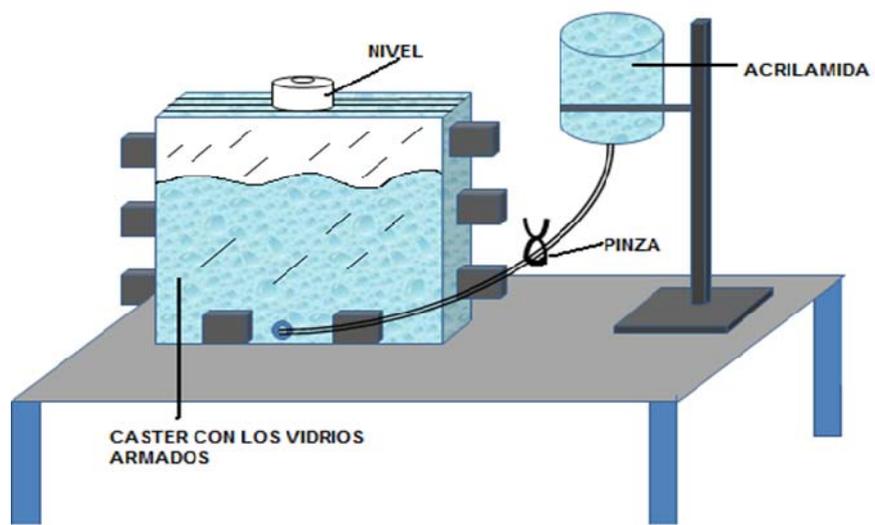
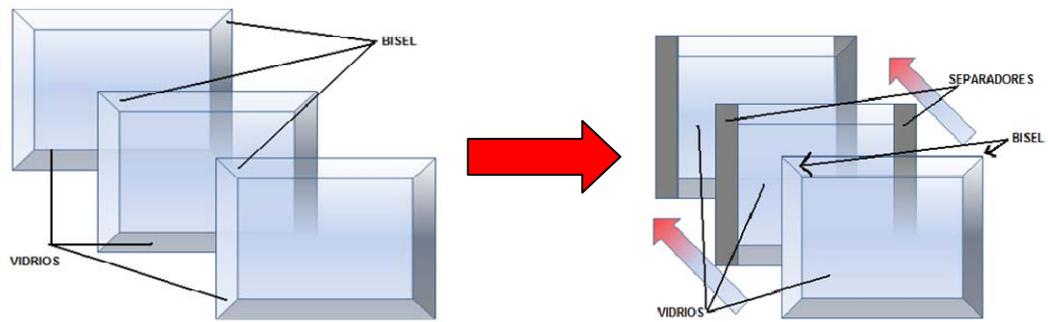


Figura 27. Segunda dimensión.

8.8 Tinción con plata.

Después de que terminó la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular, los geles correspondientes se colocaron en charolas de plástico previamente lavadas con mezcla crómica y H₂O mili Q, y fueron preparados para ser teñidos. Siguiendo el siguiente procedimiento (tabla 15).

PROCEDIMIENTO	SOLUCIONES	TIEMPO DE TRATAMIENTO
1. Fijar.	50 % MeOH; 12 % ACOH, 0.5 mL 37% HCOH/L	≥ 1 hr.
2. Eliminación de restos de la solución fijadora.	50 % EtOH	3 lavados de 20 minutos cada uno.
3. Pre-tratamiento.	Na ₂ SO ₃ .SH ₂ O (0.2 g/L)	1 minuto.
4. Eliminación de restos de la solución pre-tratamiento.	H ₂ O miliQ	3 lavados de 20 segundos cada uno.
5. Impregnar.	AgNO ₃ (2g/L)	20 minutos.
6. Eliminación de restos de la solución de impregnación.	H ₂ O miliQ	2 lavados de 20 segundos cada uno.
7. Revelar.	Na ₂ CO ₃ (60g/L) 0.5ml 37% HCOH/L; Na ₂ S ₂ O ₃ .SH ₂ O (4mg/L)	2 a 5 minutos.
8. Eliminación de restos de la solución de revelado.	H ₂ O miliQ	2 lavados de 2 minutos cada uno.
9. Solución que detiene la reacción.	ACOH al 1%	10 minutos.
10. Eliminación de restos de la solución que detiene la reacción.	H ₂ O miliQ	2 lavados de 10 minutos cada uno.

Tabla 15. Tinción con Plata.

Posteriormente los geles fueron teñidos a **Coomassie con “blue tonic”** siguiendo el siguiente procedimiento:

1. SOLUCIONES:
 - a. Cl_3Fe al 5%: 2.5 g en 50 mL de H_2O mili Q.
 - b. $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 / (\text{COOH})_2$ al 3%: 1.5 g en 50 mL de H_2O mili Q.
 - c. $\text{C}_6\text{FeK}_3\text{N}_6$: 1.75 g en 50 mL de H_2O mili Q.
2. Una vez preparadas cada una de las soluciones por separado, se agregaron 70 mL de H_2O en una probeta de 100 mL y posteriormente se agregaron cada una de las soluciones (10 mL de c/ solución) en orden estricto: a, b y c; y se mezclaron.
3. Se agregaron los 100 mL finales (H_2O + 3 soluciones) al gel, de 2 a 3 minutos hasta que los geles cambiaron de color café oscuro a azul.
4. Se lavaron 3 veces con 250 mL de H_2O , 5 minutos por lavado.
5. Se agregó la solución estabilizadora : 20 % CH_3OH + 5% CH_3CO_2 :
6. Se lavaron 2 veces con H_2O .

8.9 Escaneo de los geles en 2-D y análisis de las imágenes.

Una vez que los geles estaban teñido se digitalizaron utilizando Escáner GS-800 Calibrated Densitometer BIO-RAD y las imágenes fueron procesadas con el Software Quantity ONE versión 4.6.5. Después de escanear los geles las imágenes obtenidas fueron analizadas en el “Software PD Quest Advanced 2-D analysis”, versión 8.0.1 de BIO-RAD.

9. Resultados.

9.1 Recolección y almacenamiento de muestras: En este paso se buscó asegurar la integridad del Proteoma para obtener reproducibilidad de los ensayos. Para esto fue necesario y fundamental mantener las muestras de tejido fresco a una temperatura de -70°C. Tomando en cuenta además de que el contenedor se encuentre estéril. Otro importante aspecto a determinar son los parámetros clínicos e histológicos de las muestras de las pacientes que estudiamos. A continuación se encuentran los datos de las pacientes de las cuales se obtuvieron las muestras de tejido fresco (tumoral y tejido adyacente) tabla 16.

Clave muestra	Edad	Mama afectada	Estadio	Diagnóstico Histopatológico.
1	47 años	Derecha.	T2N1M0 EC IIA	Carcinoma ductal infiltrante.
2	50 años	Derecha.	T1N0M0 EC IIA	Carcinoma ductal infiltrante.
3	52 años	Derecha.	T2N0M0 EC IIA	Carcinoma lobulillar infiltrante.
4	42 años	Izquierda.	T2N1M0 EC IIB.	Carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado Multicéntrico.
5	45 años	Izquierda.	T2N1M0 EC IIB	Carcinoma ductal infiltrante.
6	49 años	Derecha.	T3N0M0 ECIIB	Carcinoma ductal infiltrante.
7	56 años	Izquierda.	T2N2M0 ECIIIA	Carcinoma ductal infiltrante.
8	37 años	Derecha.	T3N1M0 ECIIIA	Carcinoma ductal infiltrante.
9	33 años	Derecha.	T4N2M0 ECIIB	Carcinoma canalicular infiltrante.

Tabla 16. Características clínicas de las pacientes.

9.2 Cuantificación de proteínas. Rendimiento de [] de proteínas totales

Muestra / Estadio clínico	[] de proteínas totales ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	Rendimiento (μg)
1T / ECIIA	3.8	228
1TA	4.7	235
2T / ECIIA	5.9	531
2TA	2.8	1400
3T / ECIIA	2.6	130
3TA	4.0	2000
4T / ECII B	1.6	80
4TA	1.35	67.5
5T / ECII B	4.9	245
5TA	5.6	280
6T / ECII B	1.25	43.75
6TA	1.4	49
7T / EC IIIA	4.3	215
7TA	3.2	160
8T / EC IIIA	1.4	70
8TA	1.25	62.5
9T / EC IIIB	4.7	329
9TA	2.2	66

Tabla 17. Rendimiento de la [] de proteínas totales.

T: Tumor
TA: Tejido Adyacente

9.3 Geles de acrilamida-bisacrilamida SDS-PAGE AL 12 %.

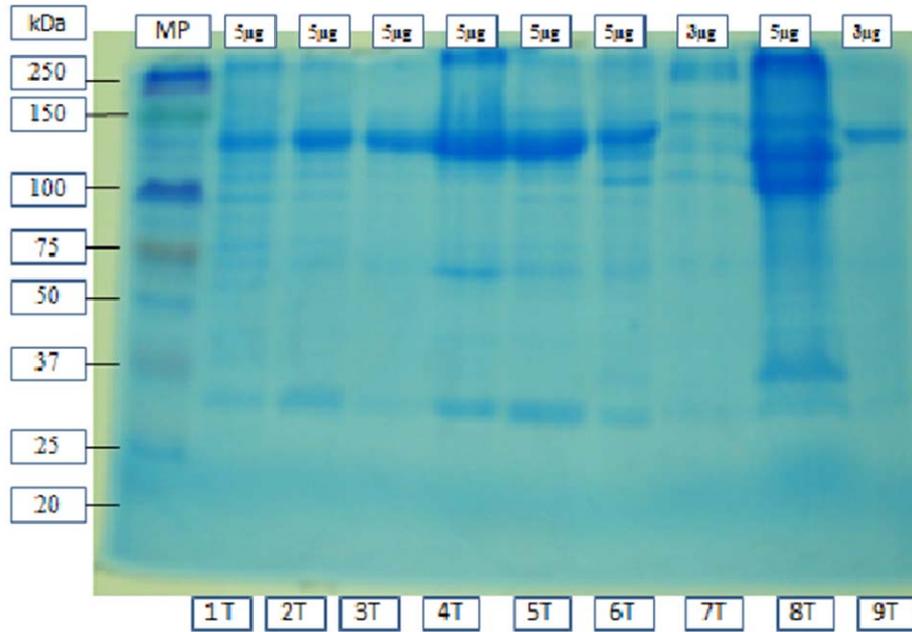


Figura 28. SDS-PAGE al 12 % de tejidos neoplásicos, teñido con azul de Coomassie.
T: Tumor , MP: Marcador de peso molecular.

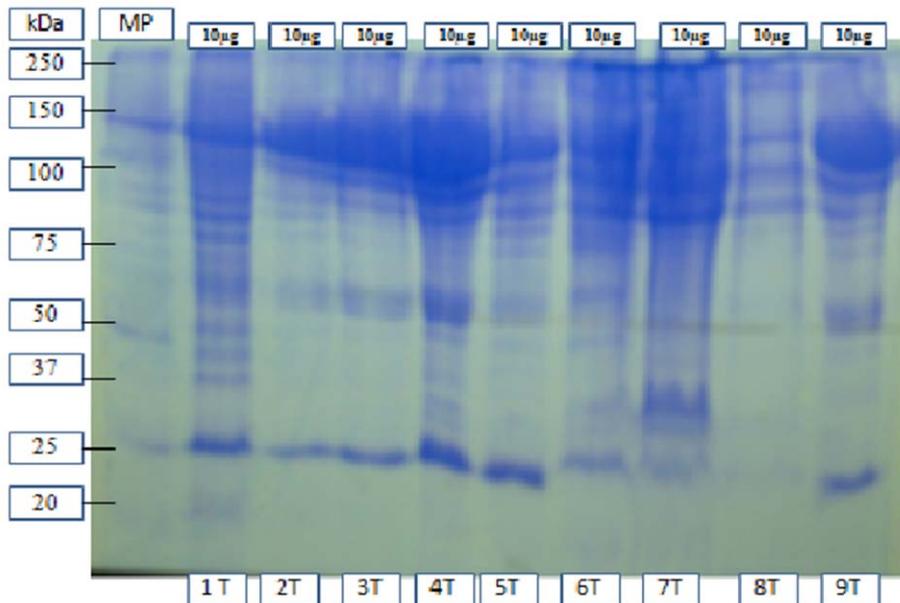


Figura 29. SDS-PAGE al 12 % de tejidos neoplásicos, teñido con azul de Coomassie.
T: Tumor, MP: Marcador de peso molecular.

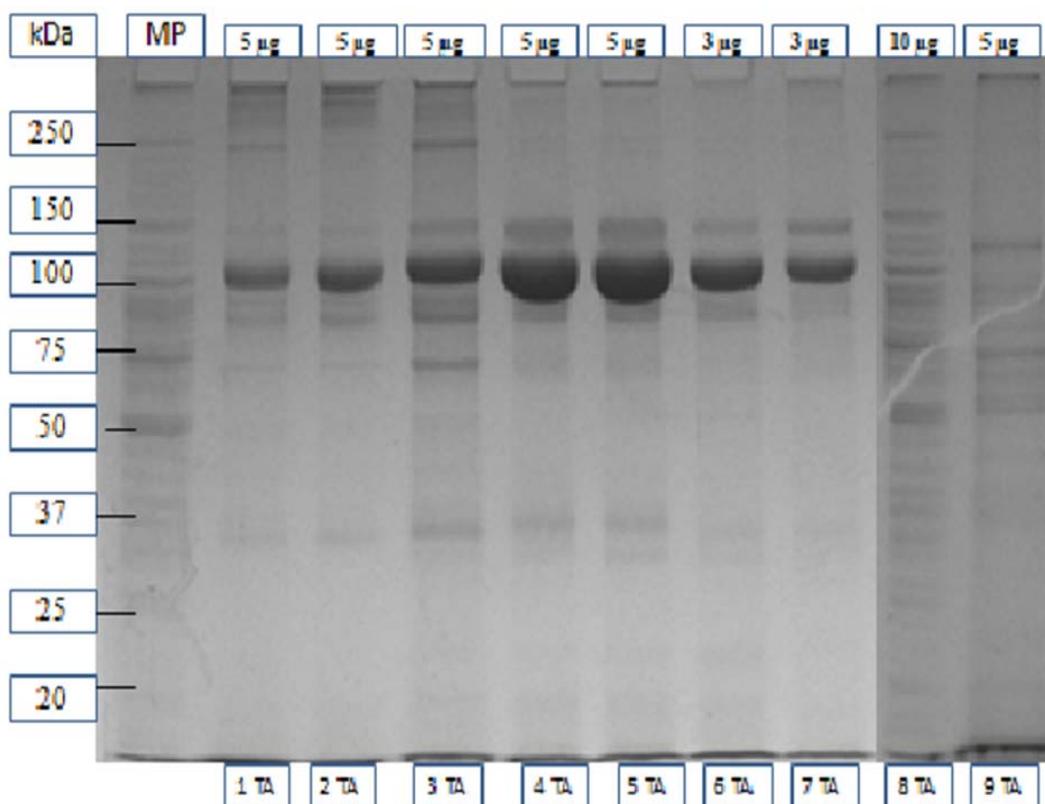


Figura 30. SDS-PAGE al 12 % de tejidos adyacentes, teñido con azul de Coomassie.
TA: Tejido Adyacente, MP: Marcador de peso molecular.

9.4 Electroforesis bidimensional:

- Geles en 2-D PAGE de muestras de tejido tumoral. Formato de 12 x 12cm, con 100 μ g de proteínas. Ambos geles pertenecen a pacientes con cáncer de mama, en donde se conserva un perfil de expresión de proteínas, aunque también encontramos diferencias marcadas. Este ensayo fue un primer acercamiento, para verificar la calidad de las muestras y la resolución de la electroforesis bidimensional con capilares. Estas muestras no fueron incluidas en el análisis final ya que carecían de algunos de los criterios de inclusión, por ejemplo la edad y además estaban recibiendo tratamiento previo a la toma de la biopsia.

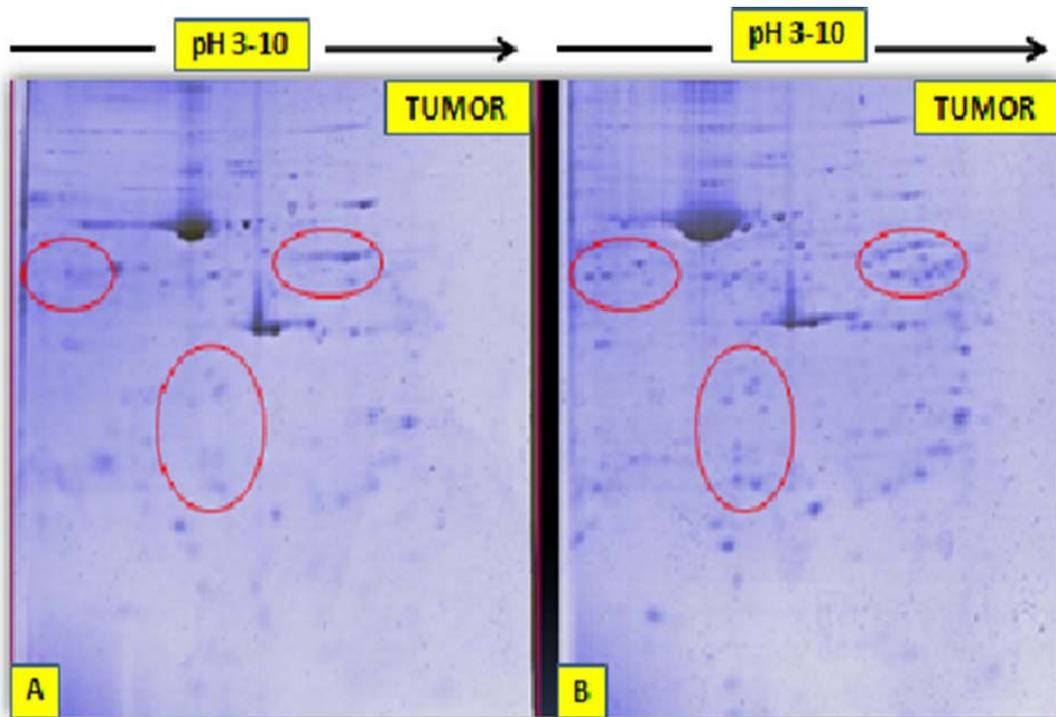


Figura 31. 2-D PAGE de tejidos tumorales. A: Tejido tumoral (Carcinoma ductal infiltrante, ECIA) de paciente con 70 años de edad, tratada con Quimioterapia. B: Tejido tumoral (Carcinoma ductal infiltrante, ECIB) de paciente con 72 años de edad, tratada con Radioterapia. En los círculos se encuentran proteínas con diferencias en su expresión.

Con estas muestras también realizamos geles 2-D PAGE en formato de 22 x 22cm con 500 μ g de proteínas. La calidad de las muestras fue satisfactoria y la resolución obtenida también. El perfil de expresión de las proteínas que se puede observar en esta imagen es similar con la literatura reportada con respecto a la distribución de los puntos (círculos rojos) V. SIENA 2D-DATABASE.

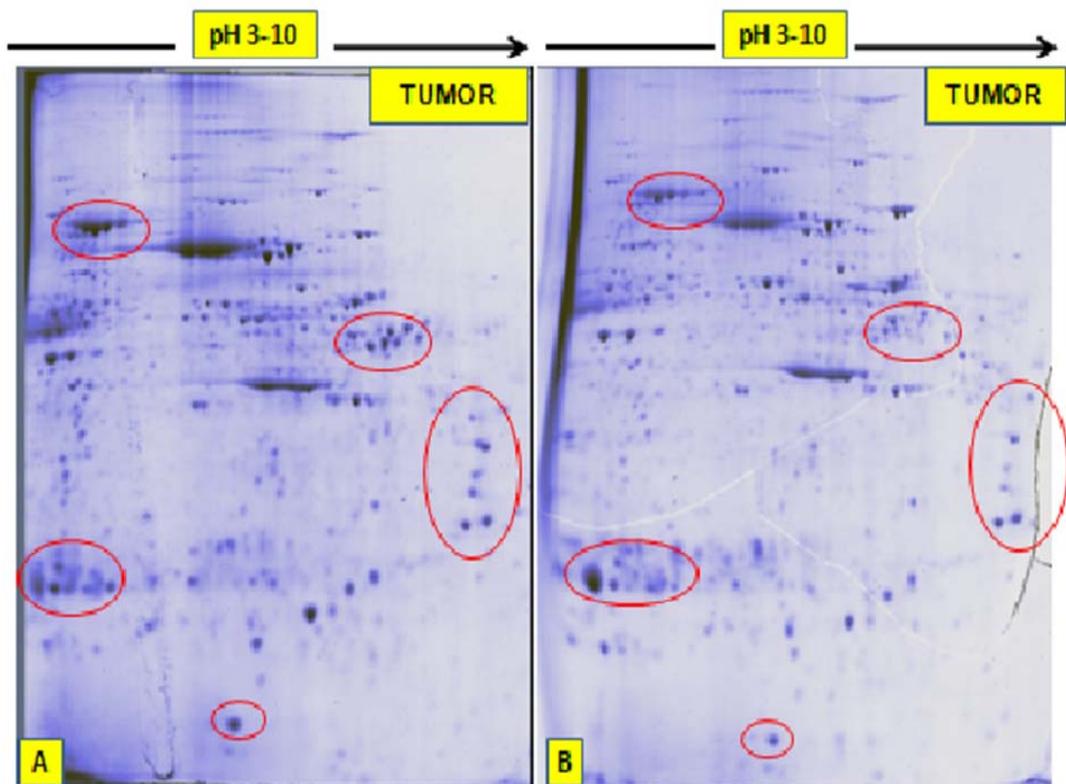


Figura 32. 2-D PAGE de tejidos tumorales. A: Tejido tumoral (Carcinoma ductal infiltrante, ECHIA) de paciente con 70 años de edad, tratada con Quimioterapia. B: Tejido tumoral (Carcinoma ductal infiltrante, ECHIB) de paciente con 72 años de edad, tratada con Radioterapia.

A continuación se muestran las imágenes de los geles en 2-D que se realizaron con las muestras definitivas y que posteriormente se analizaron con el software PD-Quest.

Estos geles fueron realizados en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 1 de Tejido Tumoral (1T) y su Tejido Adyacente (1TA) en estadio IIA. Para esta muestra se realizó un análisis por triplicado del Tejido tumoral, figura 33. Del TA se realizó un análisis por duplicado, figura 34. En esta etapa del estudio se realizó un análisis descriptivo de las imágenes. En ambos casos con reproducibilidad en cada ensayo, basándonos en el número de manchas detectadas por el software PD-Quest en cada gel. Posteriormente se muestran los datos exactos de este primer análisis.

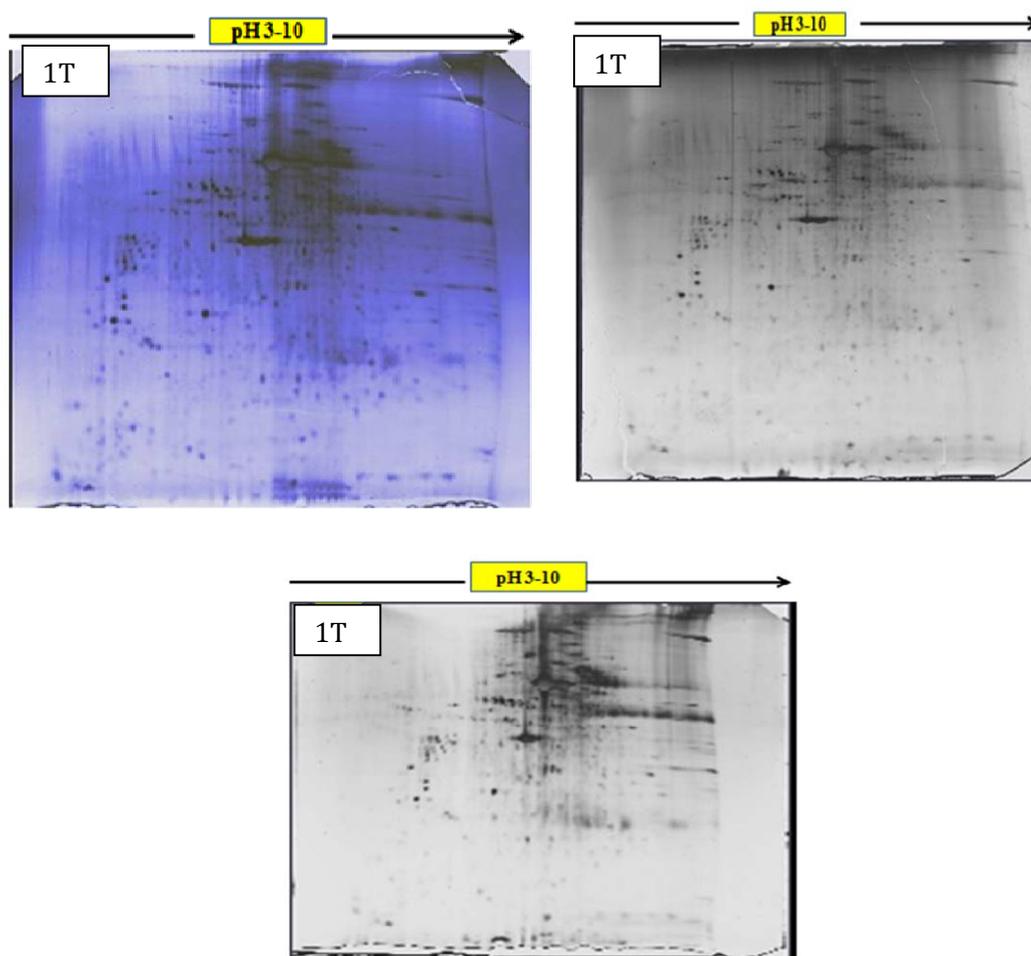


Figura 33. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñidos con plata. Análisis por triplicado. Muestra 1T.

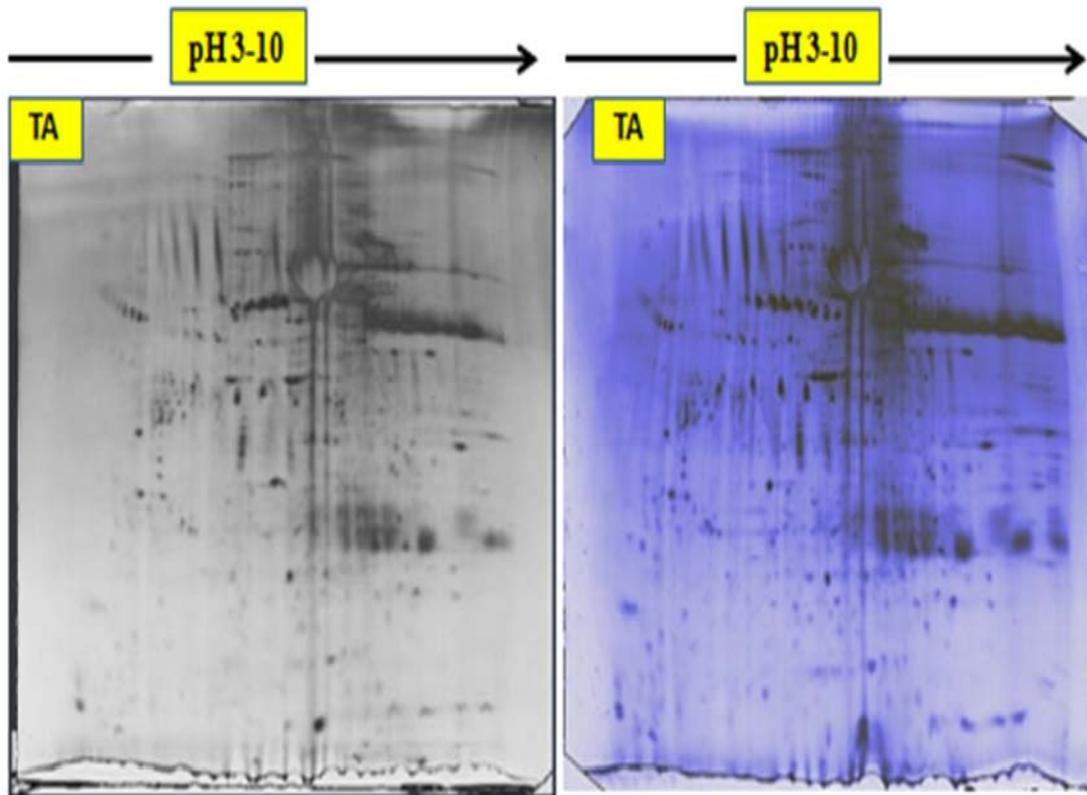


Figura 34. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 1T.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 2 de Tejido tumoral (2T) y su Tejido Adyacente (2 TA) en estadio IIA. Se realizó un análisis por triplicado del tejido tumoral, figura 35. Del TA se realizó un análisis por duplicado, figura 36. En esta etapa del estudio se realizó un análisis descriptivo de las imágenes. En ambos casos con reproducibilidad en cada ensayo, se puede observar grupos de proteínas (encerradas con un línea roja) que se encuentran presentes en todos los geles verificando de esta forma la distribución similar de las machas.

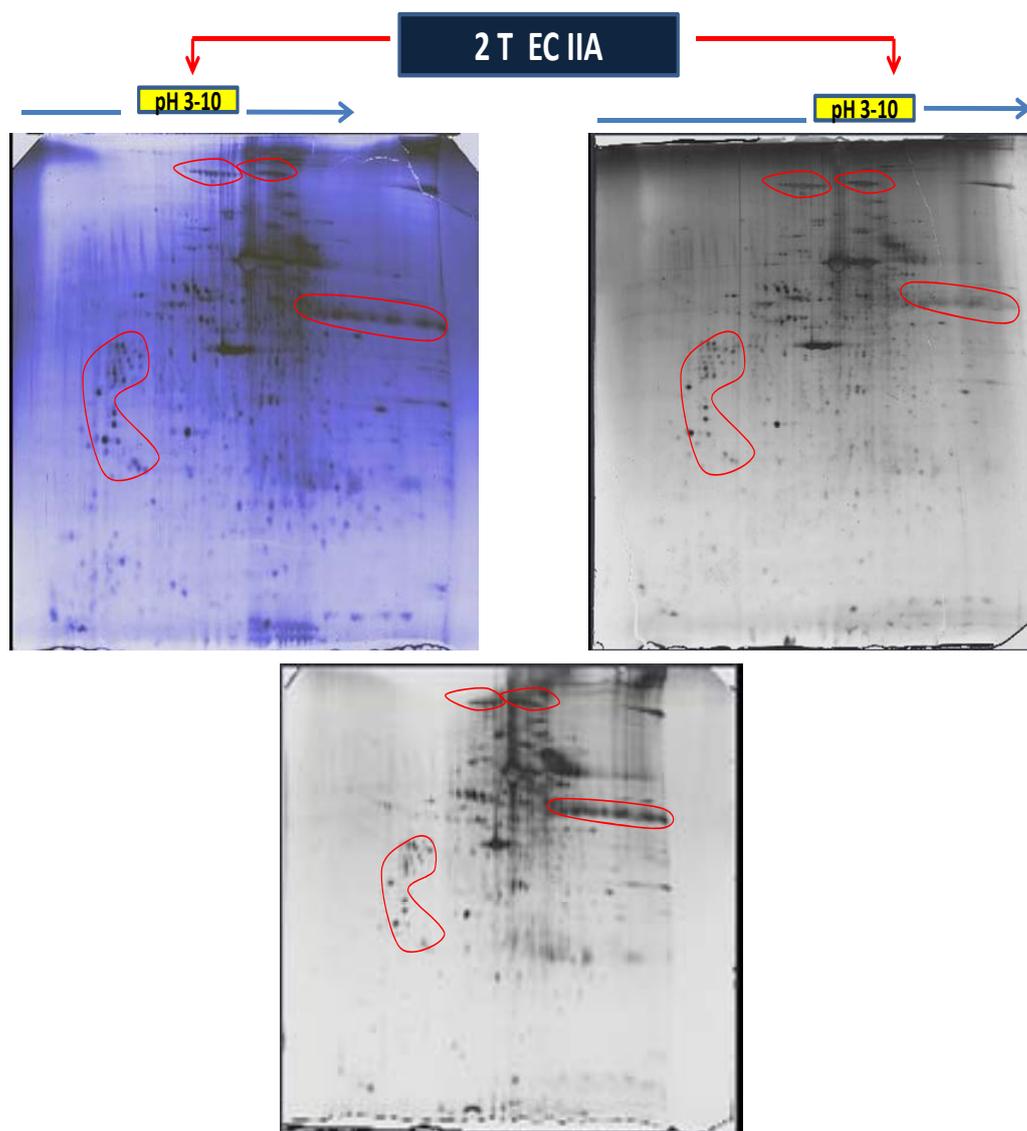


Figura 35. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñidos con plata. Análisis por triplicado. Muestra 2T.

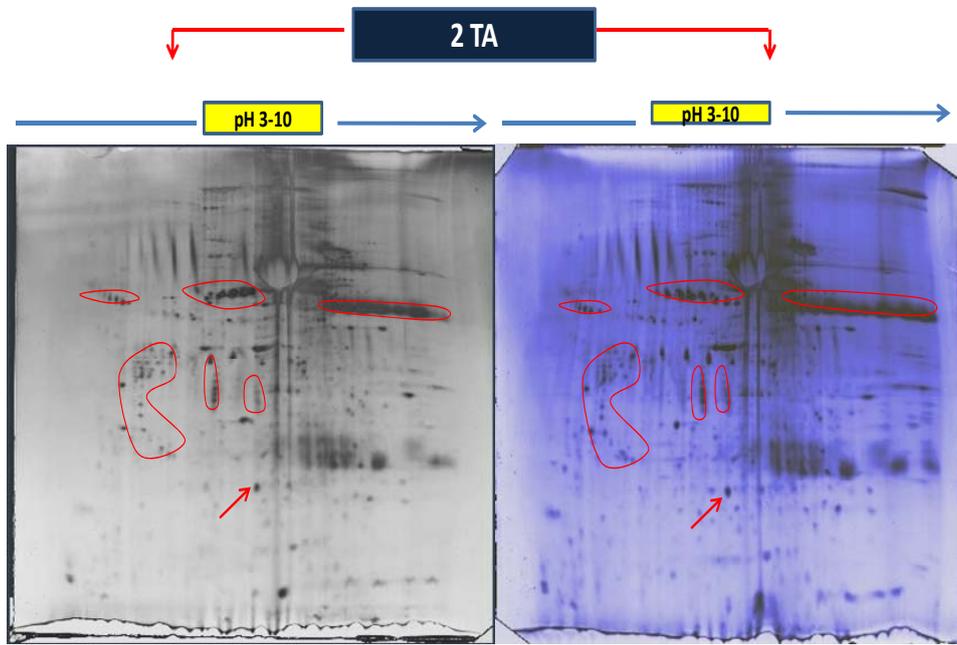


Figura 36. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 2TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 µg de proteínas de la muestra 3 de Tejido tumoral (3T) y su Tejido Adyacente (3 TA) en estadio IIA. Se realizó un análisis por duplicado del tejido tumoral, figura 37. Del TA se realizó un análisis por duplicado, figura 38. En esta etapa del estudio se realizó un análisis descriptivo de las imágenes. En ambos casos con reproducibilidad en cada ensayo, se puede observar grupos de proteínas (encerradas con un línea roja) que se encuentran presentes en ambos geles.

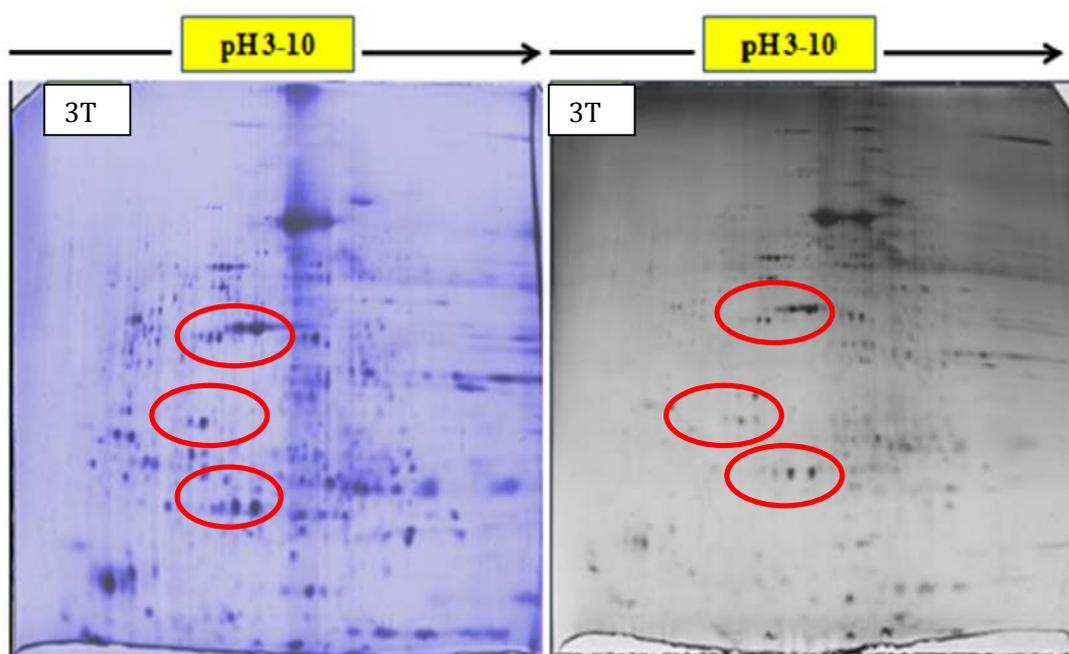


Figura 37. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 3T.

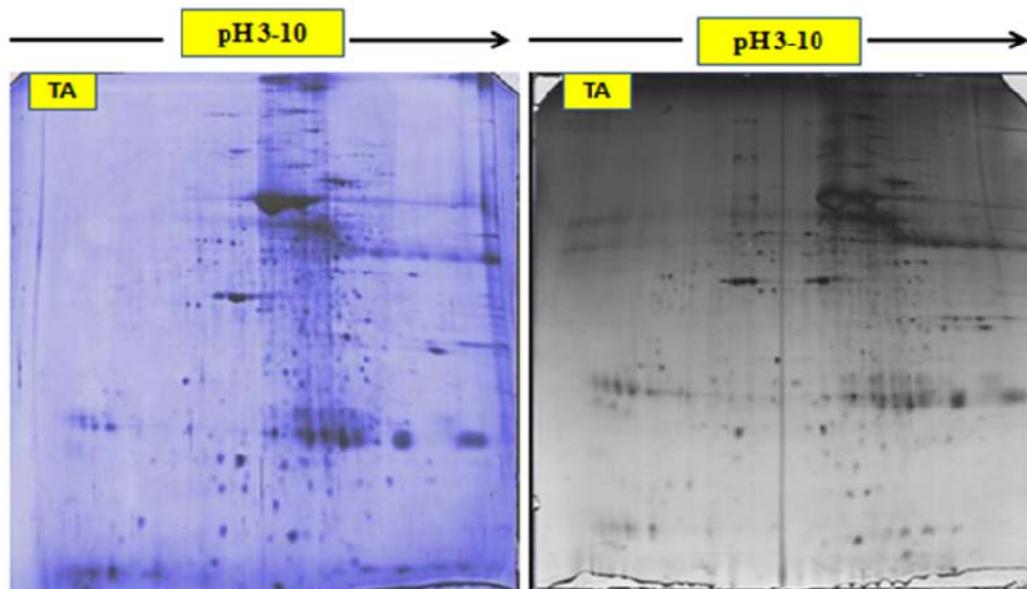


Figura 38. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 3TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 4 de Tejido tumoral (4T) y su Tejido Adyacente (4 TA) en estadio IIB. Se realizó un análisis por duplicado del tejido tumoral, figura 39. Del TA se realizó un análisis por duplicado, figura 40.

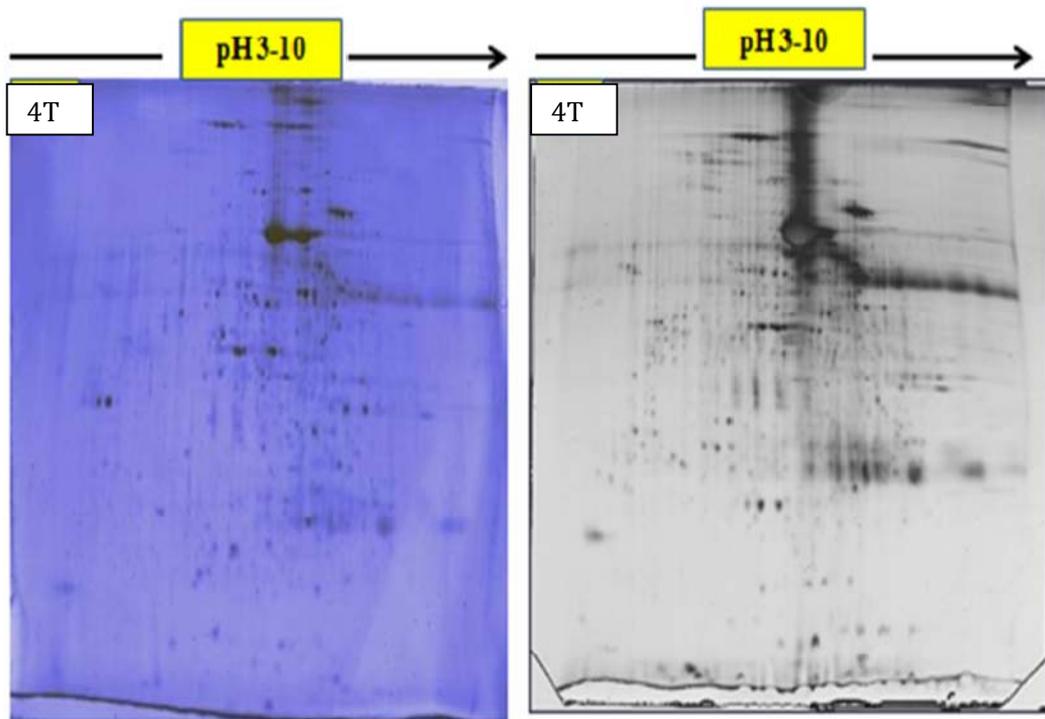


Figura 39. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 4T.

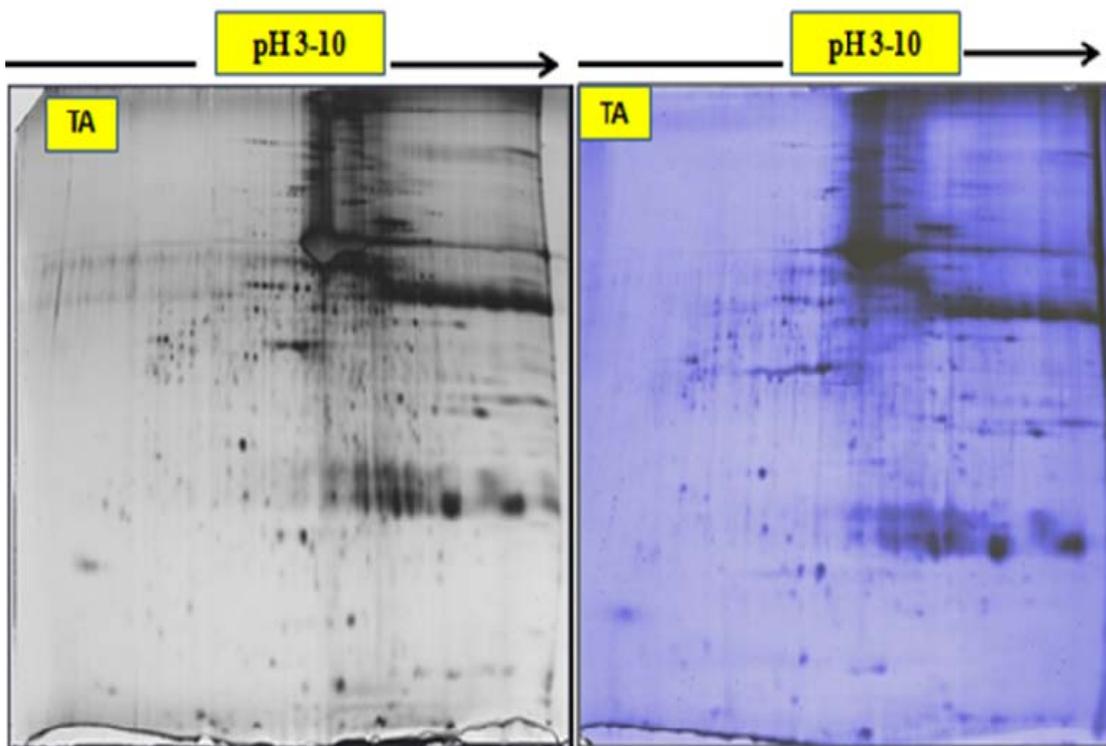


Figura 40. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 4TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 µg de proteínas de la muestra 5 de Tejido tumoral (5T) y su Tejido Adyacente (5TA) en estadio IIB. Se realizó un análisis por duplicado del tejido tumoral, figura 41. Del TA se realizó un análisis por duplicado, figura 42. En el caso del TA obtuvimos una mejor resolución al realizar el duplicado, esto basándonos en el análisis con el software PD-Quest y el número de manchas detectadas.

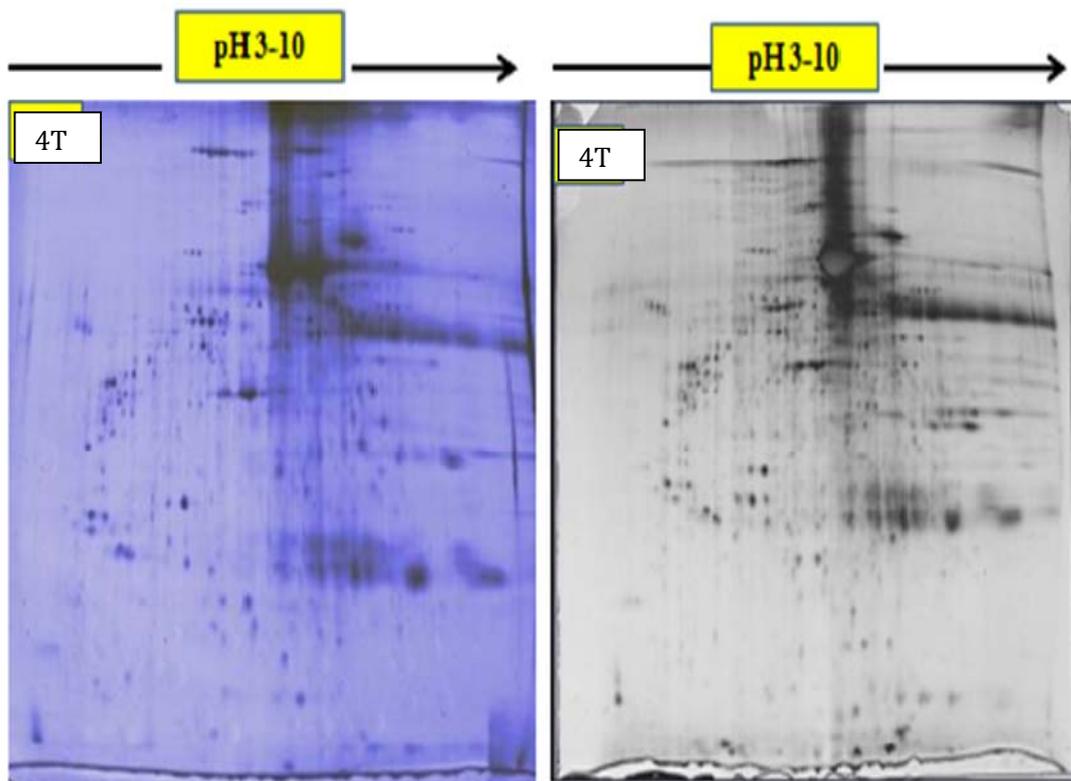


Figura 41. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 5T.

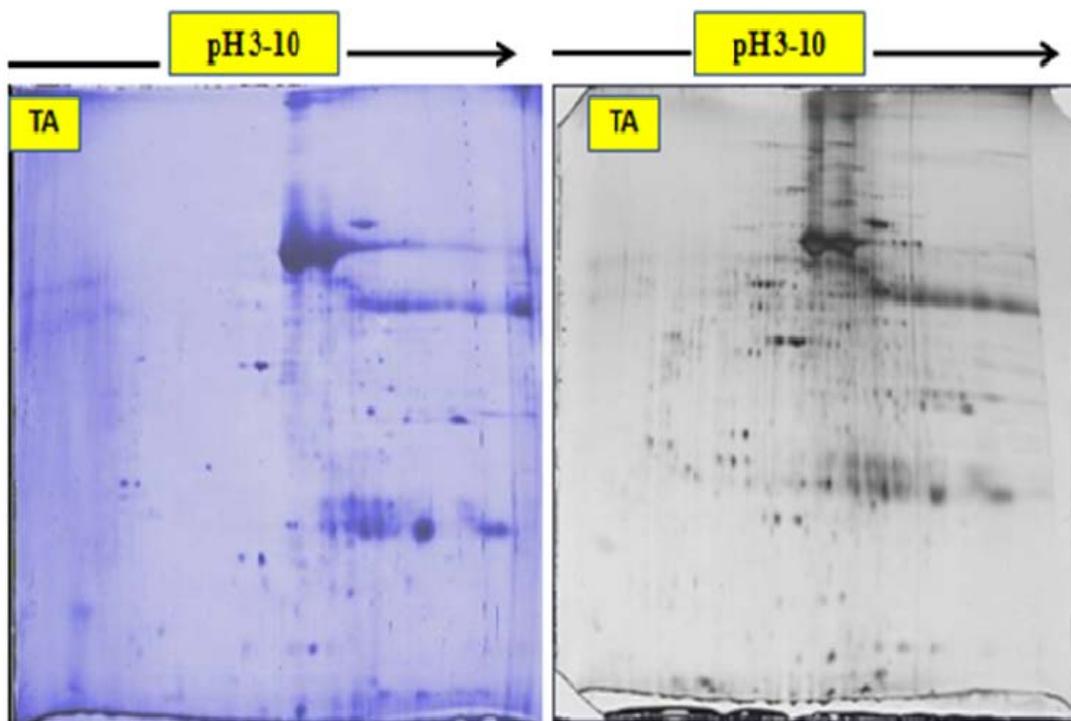


Figura 42. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñidos con plata. Análisis por duplicado. Muestra 5TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 6 de Tejido tumoral (6T) en estadio IIB. En este caso solo se realizó el análisis de un solo gel ya que la cantidad de la muestra no nos permitió hacer duplicado, figura 43.

Además se obtuvo una mala resolución, esto debido a la mala calidad de la muestra.

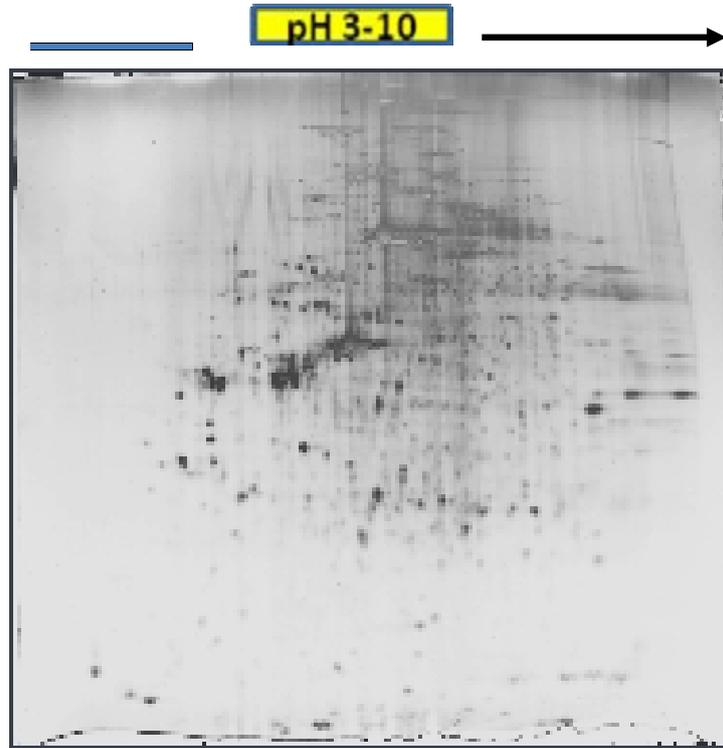


Figura 43. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñido con plata. Muestra 5TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 7 de Tejido tumoral (7T) y su Tejido Adyacente (7TA) en estadio IIIA. Se realizó un análisis por duplicado del tejido tumoral, figura 44. Del TA se realizó el análisis de un solo gel, figura 45. Además en este caso se contaba con una cantidad suficiente de la muestra para realizar un análisis por duplicado agregando un marcador de peso molecular para geles en 2-D, el duplicado de la muestra se realizó con 50 μ g de proteínas y se agregaron 10 μ g del marcador 2-D SDS-PAGE. En este caso se encontró una mancha (flecha y círculo rojo) que pertenece al marcador 2-D SDS-PAGE (con un pI de 4.5 y 21, 500 kDa), figura 44.

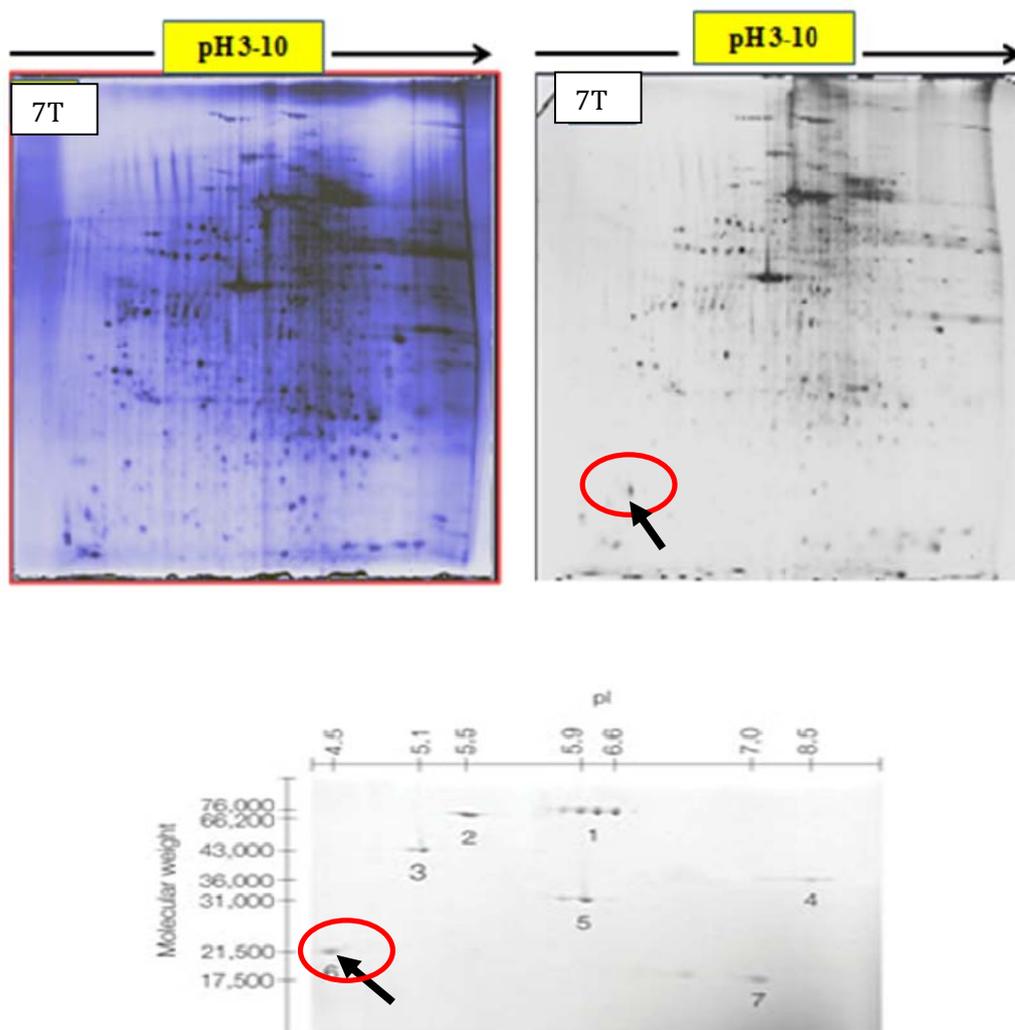


Figura 44. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñido con plata. Muestra 7T. Duplicado con marcador 2-D SDS-PAGE.

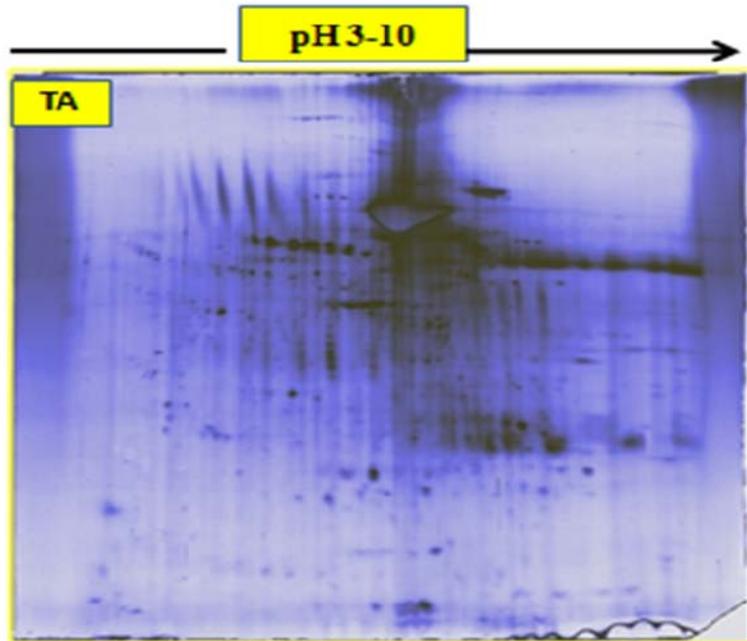


Figura 45. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñido con plata. Muestra 7TA.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 8 de Tejido tumoral (8T) en estadio IIIA. Se realizó el análisis de un solo gel ya que la cantidad de la muestra no era suficiente para realizar duplicado, figura 46.

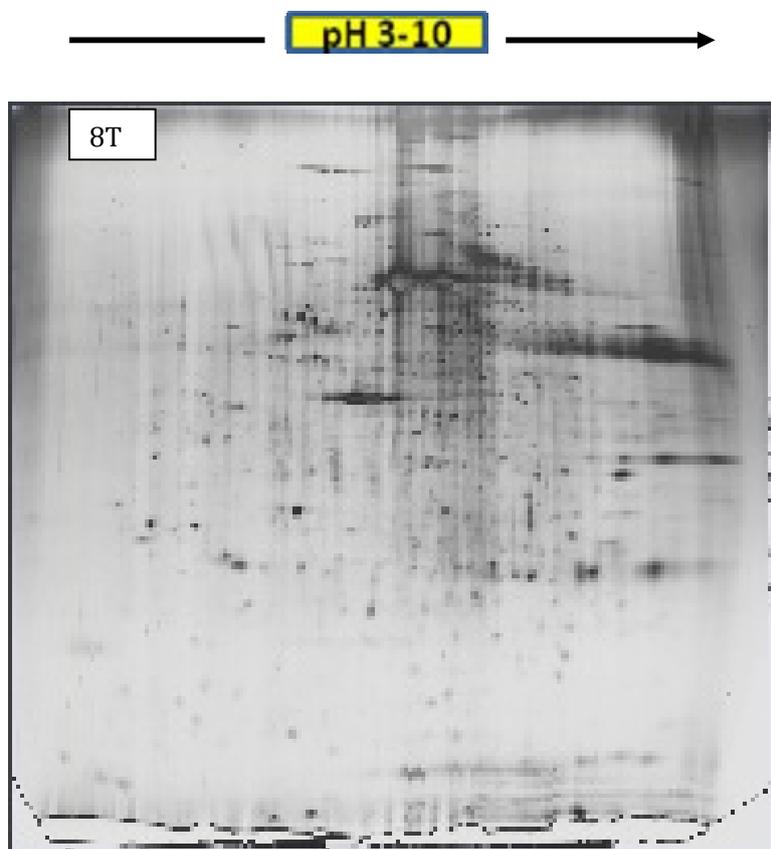


Figura 46. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñido con plata. Muestra 8T.

Geles en formato de 22 x 22 cm, con 100 μ g de proteínas de la muestra 9 de Tejido tumoral (9T) y su Tejido Adyacente (9TA) en estadio IIIB. Se realizó un análisis por duplicado del tejido tumoral, figura 47. Del TA se realizó el análisis de un solo gel, figura 48.

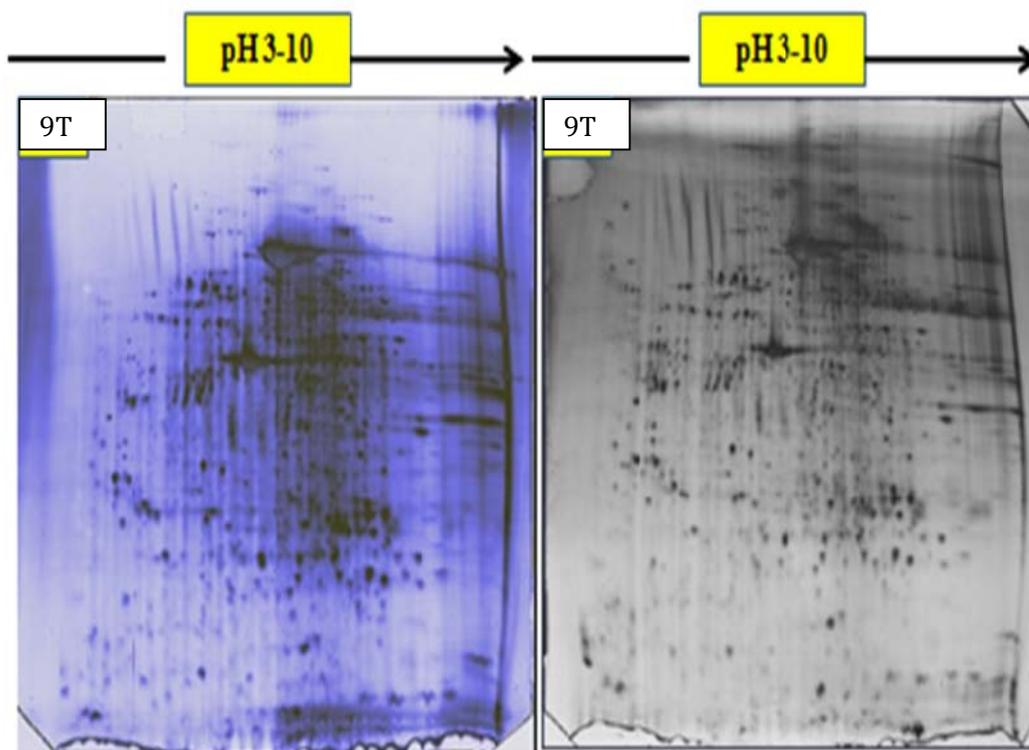


Figura 47. 2-D PAGE de tejido tumoral, teñido con plata. Muestra 9T.

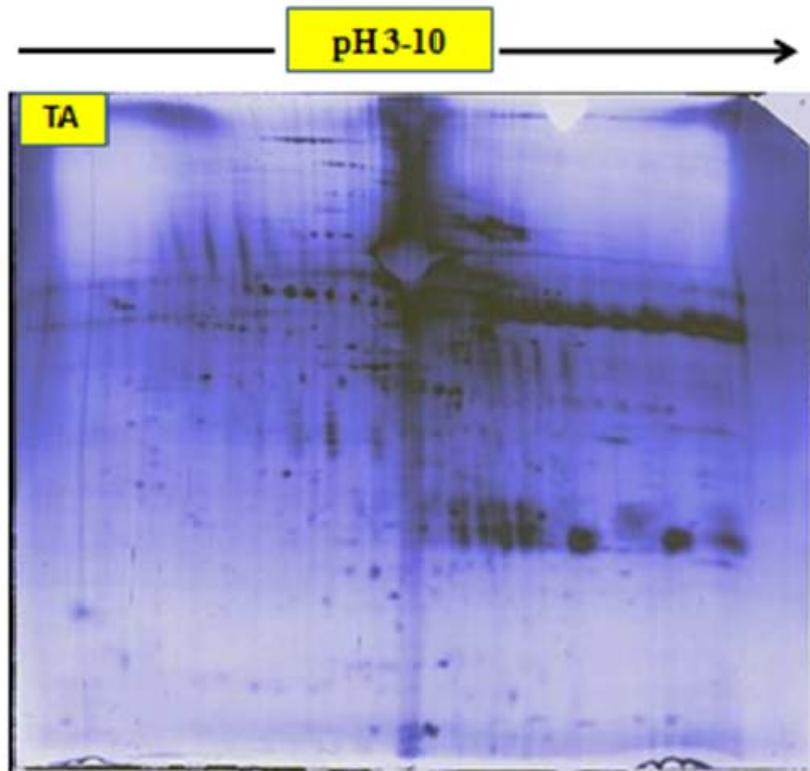


Figura 48. 2-D PAGE de tejido adyacente, teñido con plata. Muestra 9TA.

9.5 ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES:

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el Software PD Quest Advanced 2-D analysis, versión 8.0.1 de BIO-RAD. Las muestras se agruparon según el estadio clínico, es decir de manera progresiva, desde el estadio IIA hasta el estadio IIB, para realizar el análisis primer nivel de los perfiles de expresión proteicos. Además se seleccionaron las imágenes de los geles que presentaron un mayor número de manchas.

GRUPO 1. Tejidos Tumorales. Estadio IIA y IIB.
Muestra 2T ECIIA
Muestra 6T ECIIIB
Muestra 4T ECIIIB

GRUPO 2. Tejidos Adyacentes. Estadio IIA y IIB.
Muestra 2TA ECIIA
Muestra 6 TA ECIIIB
Muestra 4 TA ECIIIB

GRUPO 3. Tejidos Neoplásicos. Estadio IIIA y IIB.
Muestra 7T ECIIIA
Muestra 8T ECIIIA
Muestra 9T ECIIIB

GRUPO 3. Tejidos Adyacentes. Estadio IIIA y IIB.
Muestra 7TA ECIIIA
Muestra 8 TA ECIIIA
Muestra 9 TA ECIIIB

El software PD-Quest es un programa de computadora especializado para el procesamiento de imágenes de geles 2-DE. Este programa nos permitió analizar y comparar simultáneamente varios geles, detectando y comparando automáticamente en cada uno de ellos todas las proteínas presentes. Cada imagen fue re-analizada de forma manual para eliminar errores en el análisis automático y remover partículas contaminantes de las imágenes. Este análisis produjo una imagen digital del gel y se determinó la cantidad de la proteína, la posición en el gel y la calidad de la mancha. Además se verificó cada mancha con una herramienta de este software “3D viewer” en la cual es posible visualizar a las manchas en tercera dimensión obteniendo una imagen clara de la proteínas detectadas y asegurar que no fueran artefactos o contaminantes.

La cantidad de una proteína se refiere a la intensidad total de una mancha en particular, comparada con un patrón estándar de proteínas de concentración conocida. Todos los geles fueron normalizados para que la calidad y la cantidad de las manchas (proteínas) tuvieran el mismo significado para cada muestra analizada. De esta manera los perfiles de expresión proteicos obtenidos de los geles bidimensionales, se analizaron cuantitativamente y obtuvimos además un acercamiento de un análisis cualitativo.

El análisis cualitativo que se realizó con este software se refiere a las manchas que aparecen en un solo grupo de geles, es decir en una sola condición en comparación con el otro grupo de geles. Es decir son proteínas propias de un grupo pero no están en el otro con el que lo estas comparando. El análisis cuantitativo se refiere entonces a todos aquellos spots detectados con el software que presentan diferencias en la expresión cuantitativa, es decir si están sobre -expresados al menos 2 veces por arriba con respecto al grupo que se está comparando, todo esto de acuerdo a los parámetros y normalización establecidos previamente. Y el análisis estadístico se refiere a aquellas proteínas que se encuentran expresadas diferencialmente en los dos grupos que se compararon y que poseen diferencias significativas (significancia del 95%, students t-test).

ANÁLISIS DEL GRUPO 1:

Este corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los Tumores en Estadio IIA y IIB. Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de tres geles distintos y se tomaron en cuenta las manchas comunes a todos ellos.

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos al analizar cada una de las imágenes correspondiente a las muestras en esta etapa, el número de “spots” ó manchas corresponden a todas las proteínas encontradas en cada gel y los “spot matched to every member” corresponden a las proteínas emparejadas o adaptadas en los 3 geles.

Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 3 geles
Muestra 2T ECIIA	1155	336
Muestra 6T ECIIB	1209	
Muestra 4T ECIIB	739	

ANÁLISIS DEL GRUPO 2:

Este corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los Tejidos Adyacentes en Estadio IIA y IIB. Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de tres geles distintos y se tomaron en cuenta las manchas comunes a todos ellos.

Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 3 geles
Muestra 2 TA ECIIA	993	451
Muestra 6 TA ECIIB	931	
Muestra 4 TA ECIIB	739	

ANÁLISIS DEL GRUPO 3:

Este corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los TN en Estadio IIIA y IIIB. Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de tres geles distintos y se tomaron en cuenta las manchas comunes a todos ellos.

Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 3 geles
Muestra 7T ECIIIA	1105	541
Muestra 8T ECIIIA	1267	
Muestra 9T ECIIIB	1177	

ANÁLISIS DEL GRUPO 4:

Este corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los TA en Estadio IIIA y IIIB. Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de tres geles distintos y se tomaron en cuenta las manchas comunes a todos ellos.

Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 2 geles
Muestra 7 TA ECIIIA	649	312
Muestra 9 TA ECIIIB	763	

Posteriormente las imágenes de las muestras se agruparon para realizar la comparación entre las muestras que representaban al estadio clínico IIA y IIB vs las muestras en estadio IIIA y IIIB previamente analizados, es decir se realizó un análisis de segundo nivel.

Grupo A.

GRUPO A. Tejidos Neoplásicos Estadio IIA y IIB vs Tejidos Adyacentes Estadio IIA y IIB		
Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 6 geles
Muestra 2T ECHIA	1155	280
Muestra 6T ECIIB	1209	
Muestra 4T ECIIB	739	
Muestra 2 TA ECHIA	993	
Muestra 6TA ECIIB	931	
Muestra 4TA ECIIB	730	

Obteniendo el siguiente análisis:

ANÁLISIS	Manchas
Cualitativo	57
Cuantitativo	380
Estadístico	77

Grupo B.

GRUPO B. Tejidos Neoplásicos Estadio IIIA y IIIB vs Tejidos Adyacentes Estadio IIIA y IIIB		
Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 5 geles
Muestra 7T ECIIIA	1088	208
Muestra 8T ECIIIA	1261	
Muestra 9T ECIIIB	1169	
Muestra 7TA ECIIIA	643	
Muestra 9TA ECIIIB	746	

Obteniendo el siguiente análisis.

ANÁLISIS	MANCHAS
Cualitativo	69
Cuantitativo	378
Estadístico	41

Grupo C:

GRUPO C. Tejidos Neoplásicos Estadio IIA y IIB vs Tejidos Neoplásicos Estadio IIIA y IIIB		
Muestra	Número de manchas	Manchas emparejadas en los 6 geles
Muestra 2T ECIIA	1155	240
Muestra 6 T ECIIIB	1209	
Muestra 4 T ECIIIB	739	
Muestra 7T ECIIIA	1105	
Muestra 8T ECIIIA	1267	
Muestra 9T ECIIIB	1177	

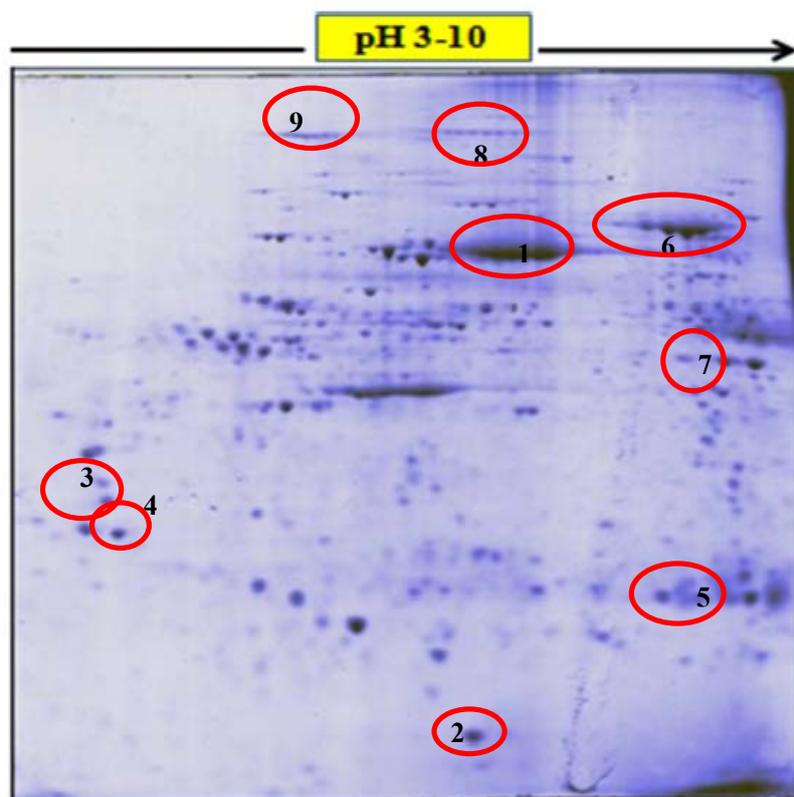
ANÁLISIS	MANCHAS
Cualitativo	67
Cuantitativo	650
Estadístico	39

Grupo D.

GRUPO D. Tejidos Adyacentes Estadio IIA y IIB vs Tejidos Adyacentes Estadio IIIA y IIIB		
Muestra	Número de spots	Spot matched to every member
Muestra 2 TA ECIIA	960	200
Muestra 4 TA ECIIIB	910	
Muestra 5 TA ECIIIB	720	
Muestra 7 TA ECIIIA	628	
Muestra 9 TA ECIIIB	742	

ANÁLISIS	
Cualitativo	83
Cuantitativo	358
Estadístico	61

Además de la información obtenida con este análisis pudimos obtener los patrones o perfiles de expresión proteicos de cada una de las pacientes y al comparar con lo ya reportado pudimos observar similitudes en los patrones de expresión de las proteínas, basándonos en su distribución. Y pudimos observar e inferir algunas de los grupos de proteínas identificadas por punto isoeléctrico y masa molecular en teoría. A continuación enumeradas, figura 49.



Número	Nombre de la proteína	Nombre abreviado	pI / MW
1	Albumina sérica	ALBU	5.92/ 69367 (múltiples formas)
2	Ubiquitina	UBIQ	6.86 / 8 313
3	Tropomiosina α 4	TPM4	4.67/ 28 391
4	Proteosoma subunidad α tipo 5	PSA5	4.74/ 26 411
5	Hemoglobina α	HBA	8.73/ 15 126 Múltiples formas
6	Ig/ γ	IGHG1	8.46/ 36 106 Múltiples formas.
7	Aldolasa A	ALDOA	8.39/ 39 289
8	Fibronectina		5.6/243078
9	Colágeno tipo VI		5.26/ 109 602

Figura 49. 2-D PAGE de tejido tumoral (Carcinoma ductal), con 500 μ g de proteínas totales, teñido con plata.

10. Discusión.

Los grupos de investigadores y clínicos en diferentes estudios han tratado de detectar cambios histológicos y moleculares que reflejen los cambios fenotípicos que ocurren en la carcinogénesis de la glándula mamaria, aunque es imperativo generar más información para poder llegar a entender globalmente esta patología.

Los estudios en los que se involucran técnicas de Proteómica juegan un papel importante en la obtención de valiosa y novedosa información acerca de del carcinoma de la glándula mamaria, ya que se pueden establecer diferencias significativas en los perfiles de expresión proteica no solo entre los diferentes subtipos histológicos, también se obtiene información acerca de la progresión y se pueden distinguir estos perfiles de expresión de los tejidos no afectados. Esto puede ser utilizado para realizar un monitoreo y una estratificación específica para cada paciente.

En el presente trabajo se estudiaron un total de 9 pacientes con carcinoma de glándula mamaria. Este trabajo es el primero que se elabora en nuestro laboratorio en colaboración con Centro de Ciencias Genómicas UNAM, por lo que primero fue necesario estandarizar las técnicas adecuadas para la obtención de los extractos de proteínas, ya que las muestras provienen de biopsias y era crucial preservar cada muestra, ya que son únicas. Realizamos varios ensayos previos para optimizar los rendimientos cantidades de cada muestra, desde la extracción hasta los geles en 2-D. Es importante destacar que este estudio es el primer acercamiento para la descripción de los perfiles de expresión proteica en pacientes mexicanas con cáncer de mama y en consecuencia nos proporcionó información valiosa para llevar a cabo su posterior caracterización o identificación por medio de espectrometría de masas.

Los estudios que realizamos por medio de técnicas de Proteómica, revelaron que existen diferencias en la expresión de los perfiles proteicos provenientes de tejidos tumorales y sus tejidos adyacentes. En el grupo 1 que corresponde a los tejidos tumorales en Estadio IIA y IIB se encontraron en promedio de 800 “spots”, en los cuales observamos grupos de proteínas que se conservan constantes a pesar de la variabilidad que presenta cada paciente, 336 proteínas están presentes (en común) en las imágenes que representan este grupo.

Es decir que estas 336 manchas en común se encuentran sobre o sub-expresadas en este grupo. En el grupo 2 que corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los TA en Estadio IIA y IIB encontramos una diferencia en el número de proteínas por gel y 451 proteínas en común, esto nos indica que los tejidos adyacentes también guardan un patrón similar en la expresión de las proteínas. En el grupo 3 que corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los Tejidos tumorales en Estadio IIIA y IIIB encontramos un promedio de 1200 proteínas por gel, es decir una mayor expresión proteica en lo que respecta al grado de la patología. Esto concuerda con los reportes previamente mencionados [63, 64], además 541 proteínas se encuentran en común. En el grupo 4 que corresponde a los perfiles de expresión proteicos obtenidos a partir de los TA en Estadio IIIA y IIIB encontramos un promedio de 700 proteínas de las cuales 312 están presentes en este grupo de geles. Al realizar el análisis de segundo nivel encontramos datos interesantes al comparar los grupos anteriormente mencionados. Por cada comparación que realizamos, tanto el análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico aportaron datos importantes que servirán como base para tener un mapa de las proteínas que están expresadas diferencialmente, ya sea expresadas en un solo grupo, o bien presentes en todos pero en este caso sobre-expresadas. Cuando se compararon los tejidos tumorales en estadio IIA y IIB vs sus tejidos adyacentes se encontraron que 57 proteínas se expresan únicamente en los tejidos tumorales, 380 proteínas se encuentran en común y 77 proteínas son estadísticamente significativas. Posteriormente en el grupo de los tejidos tumorales en estadio clínico IIIA y IIIB vs sus tejidos adyacentes se encontraron 69 proteínas expresadas únicamente en los tumores, 378 proteínas se encuentran sobre o sub-expresadas en los dos grupos de geles y 41 proteínas presentan significancia estadística. En el grupo de los geles que corresponden a tejidos tumorales en estadio IIA y IIB vs tejidos tumorales en estadio IIA y IIIB encontramos 67 proteínas expresadas únicamente en los tumores en etapa IIA y IIB, 650 proteínas expresadas diferencialmente en los dos grupos y 39 con significancia estadística. En el caso del grupo de tejidos adyacentes en estadio IIA y IIB vs tejidos adyacentes en estadio IIIA y IIIB encontramos 83 proteínas expresadas únicamente en los tejidos adyacentes en estadio IIA y IIB, 358 proteínas se expresaron diferencialmente y 61 proteínas muestran diferencias estadísticamente significativas.

Con esos resultados pudimos inferir algunas de las proteínas que se encuentran expresadas en el carcinoma de mama siguiendo la información obtenida de los puntos isoeléctricos y la masa molecular, esto es relativo ya que cada gel es diferente y en cada laboratorio en el que se lleva a cabo este tipo de estudios aplican distintas metodologías, creando así una gran variabilidad en la obtención de los perfiles de expresión de proteínas, pero podemos decir que con este trabajo se establecieron bases cruciales para poder continuar hacia la identificación de las proteínas por medio de espectrometría de masas, que nos proporcionará la identificación específica de cada proteína y poder asociarlas al proceso de carcinogénesis según sus funciones.

Es importante retomar que los perfiles de expresión de las proteínas obtenidos en este proyecto son de gran importancia para la comprensión de la progresión de esta neoplasia, fue interesante observar que todos los tejidos ya sean tumorales o no compartían cierto grupo de proteínas, sin importar el subtipo histológico y las características clínicas de las pacientes. En este sentido podemos decir que el cáncer de mama es una enfermedad tan heterogénea y muy compleja por lo que se requiere de la intervención de múltiples disciplinas científicas que contribuyan a entendimiento de esta patología.

11. Conclusiones:

- Determinamos los perfiles de expresión proteica de tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado por medio de la aplicación de metodologías empleadas en la Proteómica.
- Encontramos diferencias en los perfiles de expresión proteicos entre tejido mamario neoplásico y tejido mamario no afectado, en este caso se trabajaron extractos de proteínas de muestras diferentes, las edades de las pacientes eran distintas además de los grados de la patología.

- Al comparar las imágenes obtenidas por medio de los geles en 2-DE encontramos que la expresión de las proteínas de las muestras estudiadas presentaron diferencias en su sobre o sub-expresión, además encontramos proteínas con expresión única en cada grupo estudiado. Obteniendo de esta manera un análisis descriptivo y cuantitativo de los perfiles de expresión proteica en estas pacientes que nos permitirá realizar la identificación de las proteínas de interés por medio de espectrometría de masas.

12. Perspectivas:

- Realizar geles preparativos con 500 µg de proteína de cada grupo a estudiar.
 - Seleccionar las proteínas de interés, cortarlas y realizar su posterior digestión.
 - Análisis con el espectrómetro de masas.
 - Identificación de las proteínas.
 - De las proteínas que se llegarán a identificar y que estén relacionadas en la carcinogénesis de la glándula mamaria, se sugiere realizar estudios exhaustivos para determinar su eficacia como probables biomarcadores con validación de éstos.
 - Implementar además el análisis proteómico del carcinoma mamario metastásico y realizar un análisis comparativo.

13. Bibliografía.

1. Bertucci F., et al. 2006. Proteomics of Breast Cancer. *Mol. Cell. Proteomics*. 5: 1772-1786.
2. INEGI. Estadísticas Vitales, 1997-2006.
3. Jemal A., et al. 2010. Cancer Statistics. *Ca. Cancer J. Clin.* 5 (60): 1-24.
4. Cotran R.S. 2005. *Patología Estructural y Funcional*. 7ª Ed. Mc Graw Hill. Pag. 274-343.
5. Mehlen P., Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer*. 6: 449-458.
6. Hunter K. W., et al. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res.* 10 (1): 1-10.

7. Croce C. M. 2008. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358:502-511.
8. Duesberg P., Li R. 2003. Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle.* 2 (3): 202-210.
9. Gordon Stamp. 2002. Breast Cancer. *Encyclopedia Life of Sciences.* 1-9.
10. Felcher D.W. 2008. Oncogene addiction versus oncogene amnesia: Perhaps more than just a bad habit?. *Cancer Res.* 68 (9): 3081-3085.
11. Boyle P. et al. 2003. Cancer control in women. Update 2003. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 83: 179-202.
12. Vidal M. S. 2008. Cáncer de mama hereditario: Identificación y elección de pacientes para estudio molecular de los genes BRCA. *Cancerología.* 3: 51-61.
13. Cabrera D.A. et al. 2008. Cáncer de mama en México: perfil epidemiológico a partir de los sistemas de información y vigilancia epidemiológica, 1998-2006. *GAMO.* 7 (5): 161-168.
14. Moore K.L., Dalley A.F. 2002. Anatomía con orientación clínica. 4ª ed. Panamericana. Pag. 74 - 82.
15. Putz R., Pabst R. 1994. Sobotta. Atlas de anatomía humana. 20ª ed. Panamericana. Pag. 54.
16. Breast Cancer. Report # 6. 2006 1-800-755. ADAM.
17. Carlson B.M. 2000. Embriología humana y biología del desarrollo. 2ª ed. Harcourt. Pag. 160-163.
18. Gartner L.P., Hiatt J. L. 1997. Histología. Texto y atlas. McGraw-Hill Interamericana. Pag. 422-425.
19. Guyton A.C., Hall J. E. 2000. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. McGraw Hill. Pag. 1148- 1150.
20. McPhee S.J., Papadakis M.A. 2007. Diagnóstico clínico y tratamiento. 46ª ed. McGraw Hill. Pag. 723-746.
21. Hedau S. et al. 2004. Novel germline mutations in breast cancer susceptibility genes BRCA1, BRCA2 and p53 gene in breast cancer patients from India. *Breast Cancer Res. Treat.* 88 (2): 177-186.

22. Turnbull C., Rahman N. 2008. Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 321–345.
23. Pérez S.V.M. et al. 2008. Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerología* 3: 7-17.
24. Brandan M.E., Villaseñor N.Y. 2006. Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología* 1: 147-162.
25. Braunwald E., Fauci S. A. 2009. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17^a ed. McGraw Hill. Pag 675-683.
26. Escobar P.F. et al 2006. The 2003 Revised TNM Staging System for Breast Cancer: Results of Stage Re classification on Survival and Future Comparisons among Stage Groups. *Ann. Surg. Oncol.* 14(1):143–147.
27. González-Palacios M.J. 2004. Una nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. *Rev. Esp. Patol.* 37 (3): 247-251.
28. Cotran R.S. 2005. *Patología Estructural y Funcional*. 6^a ed. Mc Graw Hill. Pag. 1149-1162.
29. Filippo E. B. et al. 2004. Manejo conservador del cáncer mamario. Experiencia en el servicio de Oncología del Hospital General de México. *GAMO*. 3 (3): 21-25.
30. Casadevall G.I. et al 2008. Cirugía conservadora y mastectomía radical modificada en el cáncer de mama de etapas I y II. *Rev. Cubana Cir.* 47 (2): 0-0. ISSN 0034-7493.
31. Morales V. F. 2006. Estrategias clínicas y desarrollo de las bases científicas en el empleo de hormonoterapia. *Cancerología*. 1: 163-175.
32. Arce C. et al. 2006. Quimioterapia adyuvante en cáncer de mama: presente y futuro. *Cancerología*. 1: 177-185.
33. Sola V. A. 2006. Radioterapia en el cáncer de mama temprano *Rev. Med. Clin. Condes.* 17(4): 211 – 215.
34. Mckusick A.V., Ruddle H.F. 1987. A new discipline, a new name, a new journal. *Genomics*. 1: 1-2.
35. Encarnación G. S. 2006. Genómica y Genómica Funcional en Microbiología. *Rev. Latinoamerican. Microbiol.* 48 (2):131-132.
36. De Hoog C.L., Mann M. 2004. Proteomics. *Annu. Rev. Human Genet.* 5: 267-293.

37. Roque A.C.A., Lowe C.R. 2006. Advances and applications of the novo designed affinity ligands in proteomics. *Biotechnol. Adv.* 24: 17-26.
38. Investigación de transferencia en cáncer: del laboratorio a la clínica 2005-2006.
39. Vispo N.S. 2004 .Combinatoria Molecular. Santiago Vispo Nelson. 1^{era} ed. *Elfos Scientiai*. Capítulo 20: 367-402.
40. Wilkins M.R. et al. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 14: 61-65.
41. Abbott A. 2001. And now for the proteome. *Nature* 15; 409 (6822): 747
42. Aldecoa B. F., Battilana G.C. 2006. Genómica y Proteómica: Un paso más. *Acta Med. Per.* 23(3): 185- 192.
43. Genes. Benjamín Lewin. Novena Edición. 2008. Edit. McGraw Hill. Pag. 258-262.
44. Klug W.S., Cummings M.R. 2000. Conceptos de Genética. 5^a ed. Prentice Hall. Pag. 385-405
45. Mojica T. et al. 2003. La Proteómica, otra cara de la Genómica. Nova publicación científica. 1: 13-16.
46. Kenyon L.G. et al. 2002. Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era: Workshop report. *Mol. Cell. Proteomics.* 1 (10): 763-780.
47. Görg A. et al. 2004. Review. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 4: 3665-3685.
48. Rabilloud T. 2006. Limits of Proteomics: Protein Solubilization Issues. *Encyclopedia of Life Sciences.* 1- 4.
49. Reisinger V., Eichacker A.L. 2008. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *Journal of proteomics.* 71: 277 – 283.
50. Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Human Genetic.* 26: 211-234.
51. O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

52. Celis E. J, Gromov S.P. 2001. Gel electrophoresis of proteins: High-resolution two-dimensional. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1- 4.
53. Taylor C.R. 2006. Proteome resolution by two-dimensional gel electrophoresis varies with the commercial source of IPG strips. *J. Proteome Res.* 5: 2919-2927.
54. Watson T.J. 2001. Mass spectrometry. Peptide sequencing. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1: 1-5
55. Yates R.J. 2001. Mass Spectrometry in Biology. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1- 5.
56. Gevaert K., Vanderkerckhove J. 2005. Protein characterization: analytical approaches and applications to proteomics. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1- 5
57. Pando R. V., Ferreira B.C. 2007. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*. V14 CS3.indd. 97-108.
58. Corrales F.J., et al. 2006. Proteómica y aplicaciones en biomedicina. *Hematológica. Edición española*. 91 (1): 42-47.
59. Futreal P.A. et al. 2004. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*. 4: 177-183
60. Kenemans P. et al. 2004. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 49: 34-43.
61. Ceballos C.G., Hernández R. N. A. 2008. Moduladores de Progresión en Cáncer de Mama. *Cancerología* 3: 41-49.
62. Loeb L.A. et al. 2008. Cancers exhibit a mutator phenotype: Clinical implications. *Cancer Res.* 68 (10): 3551-3557.
63. Pucci-Minafra I. et al. 2007. Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and non-tumoral adjacent counterparts. *Proteomics Clin Appl.* 1: 118-129.
64. Schulz D.M. et al. 2009. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 8: 3430-3438.
65. Sanders M.E. et al. 2008. Differentiating proteomic biomarkers in breast cancer by laser capture microdissection and MALDI MS. *J. Proteome Res.* 7: 1500-1507.
66. Gast M.C.W., Schellens J. H.M. 2009. Clinical proteomics in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 116: 17-29.

67. Lai T.C. et al, 2010. Secretomic and proteomic analysis of potential breast cancer markers by two-dimensional differential gel electrophoresis. *J. Proteome Res.* 9: 1302-1322.

68. Encarnación G. S. et al. 2005. Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol Proced. Online.* 7: 117-135.

69. Bradford M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

14. Mesografía.

- I. <http://www.zambon.es/areasterapeuticas/03mujer7atlas/fichas/1031.htm>
(consultada el 14 de enero del 2010).
- II. <http://www.proteinatlas.org>
- III. <http://www.conganat.org/3congreso/cvhap/010/index.htm>
- IV. <http://www.wzw.tum.de/proteomik>.
- V. <http://www.bio-mol.unisi.it/cgi-bin/2d/2d.cgi>