



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO



PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

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

TESIS

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en el área de Genética

P R E S E N T A

Eunice López Muñoz

Tutor de la tesis:
Comité tutorial:

Dr. Diego Julio Arenas Aranda
Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez
Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Dirección del tutor y de la tesista: Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS. Teléfono 56 27 69 41
Fax 55 88 51 74. Correo Electrónico: astridkaryme2001@yahoo.com.mx

México, Distrito Federal.

Agosto 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres Facundo y Lucila por darme las bases necesarias para subsistir en este maravilloso camino llamado vida.

A Amilcar, quien a mi lado sufre, ríe, disfruta, motiva, vive...el gran hombre que me acompaña día a día.

A Astrid Karyme, quien a su corta edad me ha enseñado tanto de la sencillez y a la vez de la grandeza de vivir.

AGRADECIMIENTOS

A Jehová por permitirme existir.

A mis hermanos: Jaime, Mario y Elizabeth por estar ahí desde que nací.

A Leticia y Magda por confiar en mí.

A Dorell, Karla, Luis Mario, Arizbeth y Andrey por compartirme sus sueños y sus aspiraciones.

Al Dr. Rafael Polanco† y a la Sra. Virginia de Polanco por educar y cuidar a mi gran compañero.

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez por compartir sus conocimientos y ofrecerme sus consejos.

Al Dr. Diego Arenas Aranda por la dirección de éste proyecto.

Al Dr. Normand García Hernández por su apoyo y su amistad.

A la M. en C. Judith Villa Morales por su compañía y su amistad.

Al Dr. Gelasio Zarco Espinosa por su gran colaboración, disponibilidad en la realización de mis proyectos, pero además por su gran valor humano.

Al Dr. Mauricio E. Gómez del Toro por reafirmar en mí, el arte de la medicina.

A Adelina Hernández Zarco por su esfuerzo y su confianza.

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

Lugar de realización del proyecto

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS.

El presente trabajo fue apoyado por:

- El FOFOI-IMSS a través del proyecto titulado: “Búsqueda de células neoplásicas mamarias en sangre periférica a través de la cuantificación de la expresión del gen BIK mediante RT-PCR en tiempo real en mujeres mexicanas con cáncer mamario en diferentes estadios”, con el número 2005-3603-0042.
- El FIS-IMSS a través del proyecto titulado: “Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama”, con el número 2007-785-063.
- El CONACYT a través del proyecto titulado: “Correlación de la expresión del gen BIK con la expresión de los genes hMAM y CK-19 en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama”, con el número Salud-2009-01-115296.

Parte de este trabajo:

- Ha sido publicado en The Open Biomarkers Journal 2011, 4:8-14.
- Fue acreedor al Primer Lugar del Premio “Héctor Márquez Monter” 2009 Otorgado por la Asociación Mexicana de Genética Humana.
- Contribuyó a que la tesista resultara seleccionada como Fellow Biovision. Nxt 2011 por Biovision. Org y French Academy of Sciences como uno de los mejores 100 jóvenes investigadores a nivel mundial para participar en el foro Biovision 2011 en Lyon, Francia del 27 al 29 de marzo de 2011.

INDICE

	Pág.
Resumen	8
Marco Teórico	10
Generalidades	10
Epidemiología	11
Detección temprana de cáncer de mama	11
Cuadro clínico	12
Diagnóstico	12
Diagnóstico diferencial	14
Estadificación	14
Tipos patológicos	14
Receptores hormonales	15
Receptor HER-2/Neu	16
Tratamiento	16
Pronóstico	18
Metástasis	19
Marcadores moleculares de metástasis	20
Uso de la tecnología molecular para identificar biomarcadores candidato	21
Antecedentes	22
Gen BIK	23
Estrógenos	24
Justificación y objetivos	25
Material y métodos	26
Pacientes	26
Tamaño de muestra	26
Aspectos éticos	27
Colección de muestras	28
Extracción de RNA	28
Síntesis de cDNA	29
PCR punto final	29
PCR en tiempo real	30
PCR en tiempo real con Lux Fluorogenic Primers	30
Inmunohistoquímica	32
Análisis estadístico	32
Resultados	33
Expresión de <i>BIK/NBK</i> mediante RT-PCR en sangre	33
Expresión de <i>BIK/NBK</i> mediante RT-qPCR en sangre	38
Expresión de <i>BIK/NBK</i> mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers	41
Correlación de la expresión de <i>BIK/NBK</i> en tejido neoplásico y sangre	44
Validación de la expresión con <i>CK-19</i> y <i>hMAM</i>	46
Expresión de receptores de estrógenos alfa y progesterona	48
Correlación de la expresión de <i>BIK/NBK</i> con receptores de estrógenos alfa	50
Correlación de la expresión de <i>BIK/NBK</i> con receptores de progesterona	50
Discusión	51
Conclusiones	55
Referencias	56
Anexo 1. Carta de consentimiento informado	65
Anexo 2. Hoja de recolección de datos	67
Anexo 3. Técnicas de biología molecular	68
Anexo 4. Estadificación TNM de cáncer de mama	78

I.RESUMEN

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

El Cáncer mamario constituye un problema de salud pública a nivel mundial. En nuestro país ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 40 años de edad. Con frecuencia el diagnóstico se efectúa en estadios avanzados de la enfermedad y aproximadamente el 55% de las mujeres ya presentan metástasis a nódulos linfáticos axilares al momento del diagnóstico con la consecuente disminución en la expectativa de vida para este grupo de pacientes.

Debido a que las células tumorales pueden migrar a través de la membrana basal y matriz extracelular para introducirse y viajar a través del sistema linfático o sanguíneo a un nuevo sitio, la vía hematogena ofrece una fuente potencial de células circulantes tumorales y la obtención de muestras sanguíneas puede realizarse fácilmente y a intervalos frecuentes, permitiendo el seguimiento clínico de las pacientes.

RT-PCR en tiempo real ha sido usado para la detección de marcadores específicos de células tumorales, de tal manera que cuando estos marcadores se encuentran con un cambio en el nivel de expresión con respecto al nivel basal en linfocitos de sangre periférica pueden ser indicadores de micrometástasis.

Se ha identificado la expresión de algunos genes tales como mamoglobina, maspina y citokeratina-19 en células circulantes en sangre periférica como marcadores moleculares (mediante RT-PCR en tiempo real) para detectar células circulantes tumorales mamarias mostrando diversos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo el uso de estos marcadores en la práctica clínica ha sido más difícil de lo esperado.

Debido a la escasa lista de biomarcadores disponibles, la detección e incorporación de nuevos biomarcadores con potencial valor diagnóstico, predictivo o de pronóstico en cáncer de mama constituye una prioridad.

En un estudio realizado en nuestra unidad de investigación se identificó sobre-expresión del gen *BIK/NBK*, en 90% de muestras de tejido mamario neoplásico. El gen *BIK/NBK* es un gen proapoptótico que ha sido reportado sobre-expresado en asociación con privación estrógena en una línea celular de cáncer de mama. Debido a su participación relevante en la fisiopatología del cáncer de mama, decidimos estudiar la expresión de este gen como un potencial marcador de células neoplásicas circulantes en sangre periférica de mujeres con cáncer de mama, así como determinar su asociación con la expresión de receptores hormonales en tejido mamario neoplásico.

En este estudio demostramos que la expresión de *BIK/NBK* no es un biomarcador significativo en la detección de células circulantes en sangre periférica de mujeres con cáncer de mama.

Por otro lado demostramos la asociación de la expresión de este gen con la expresión de receptores de estrógenos alfa y progesterona, lo cual podría tener importantes implicaciones clínicas y constituir un marcador predictivo y blanco terapéutico en pacientes con cáncer de mama.

II.MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES

El cáncer mamario en nuestro país ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 40 años de edad (1,2). Es heterogéneo en su presentación clínica, genética y bioquímica. La gran mayoría de mujeres afectadas presentan una masa mamaria o anomalía en el estudio mamográfico como la única manifestación clínica de la enfermedad, lo que lleva a que aproximadamente 30% de las mujeres diagnosticadas con cáncer mamario lleguen a encontrarse en estadios avanzados (3,4).

Se han identificado numerosos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer mamario (Tabla 1). La historia familiar sugiere un componente hereditario en el desarrollo de algunos cánceres de mama y ha sido considerada como uno de los mayores factores de riesgo conocidos. Se estima que 15 a 20% de mujeres con cáncer mamario tienen una historia familiar de la enfermedad (5-12).

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

Edad	Mayor de 40 años de edad
Grupo poblacional	Caucásico
Antecedentes familiares	Cáncer de mama en madre, hermana o hija, especialmente premenopáusico o bilateral
Genética	Mutación en BRCA1, BRCA2, ATM, TP53
Antecedentes personales patológicos	Enfermedad fibroquística <ul style="list-style-type: none"> • Proliferativa • Papilomatosis • Hiperplasia epitelial atípica Cáncer endometrial Cáncer en la otra mama
Historia menstrual	Menarca temprana (< de 12 años) Menopausia tardía (> de 50 años)
Embarazo	Nuliparidad Primer embarazo después de los 35 años de edad
Hormonales	Uso de estrógenos en la postmenopausia
Alimentarios y ambientales	Ingesta excesiva de grasas, alcohol, tabaquismo.

Algunos cánceres de mama hereditarios se han encontrado asociados a mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*; sin embargo la mayor parte de cáncer mamario corresponde a cáncer esporádico en donde se ha demostrado alteración en diversos factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de señalización intracelular, moléculas de adhesión celular, reguladores de ciclo celular y proteasas (13-19).

ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER DE MAMA.

Epidemiología

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial ya que se ha presentado un incremento en su incidencia y mortalidad; tan solo en los Estados Unidos de Norteamérica se calculan cerca de 200,000 casos nuevos por año y 40,000 defunciones anuales (1). En México la incidencia calculada de cáncer de mama es de 38.4 por 100 000 mujeres y ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 40 años de edad (2). En el año 2007 la tasa de mortalidad por esta causa fue de 16.4 por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años de edad, sin embargo estados de la República Mexicana como Baja California Sur, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Chihuahua, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas, reportaron una tasa de mortalidad superior a las 20 defunciones por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad (20,21).

Detección temprana de cáncer de mama

Programas de detección.

Se han realizado varios programas de detección de masas tumorales mamarias consistentes en exámenes físicos y mamográficos de mujeres asintomáticas. Estos procedimientos han logrado identificar aproximadamente cerca de diez cánceres por 1000 mujeres mayores de 50 años y cerca de dos cánceres por 1000 mujeres menores de 50 años de edad. Casi el 80% de estas mujeres tiene ganglios linfáticos axilares negativos al momento de la cirugía, mientras que en la práctica médica ordinaria el 55% de las mujeres con cáncer de mama, tiene ganglios axilares afectados, lo cual disminuye notablemente la probabilidad de supervivencia.

Tanto el examen físico como la mamografía resultan necesarios para lograr resultados óptimos en los programas de detección, ya que solo 35-50% de los cánceres mamarios tempranos pueden descubrirse sólo mediante mamografía y otro

40% puede detectarse únicamente por palpación, por ello todas las mujeres mayores de 40 años de edad son candidatas a la realización de estudio mamográfico anual (22-24).

Autoexploración.

Es una técnica útil de detección temprana de masas tumorales mamarias en donde todas las mujeres mayores de 20 años de edad deben examinar sus glándulas mamarias mensualmente a fin de detectar asimetría de las mamas, masas o alteraciones de la piel. En caso de detectar alteraciones deben acudir inmediatamente al médico para un examen físico (24).

Mamografía

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

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

La mamografía debe ser realizada antes de la obtención de una biopsia a fin de encontrar otras áreas afectadas y examinar la mama contralateral. La mamografía nunca es sustituto de biopsia ya que no revela datos de cáncer en glándulas mamarias densas como en el caso de mujeres jóvenes con cambios fibroquísticos y no puede detectar algunos cánceres medulares (25).

Cuadro clínico.

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

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

Diagnóstico.

Ultrasonido

Es efectuado para diferenciar lesiones quísticas de lesiones sólidas. Aunque no es una prueba diagnóstica, puede revelar lesiones altamente sugestivas de malignidad tales como márgenes irregulares o lesiones pequeñas sólidas asociadas. Puede detectar también la presencia de una masa irregular dentro de un quiste como en el caso del carcinoma intraquístico (26).

Mamografía

Cuando se detecta una lesión sospechosa por mamografía y no puede ser palpada por el clínico, la lesión debe ser biopsiada mediante técnica guiada por imagen (26,27).

Otras modalidades de imagen

Dentro de estas se encuentran la ultrasonografía automatizada de mama, ductografía, resonancia magnética y PET (Tomografía con emisión de positrones). Sin embargo cada una de estas técnicas tiene indicaciones precisas y no son utilizadas de rutina en el diagnóstico de cáncer de mama (28, 29).

Citología

En algunas ocasiones es útil para identificar células malignas procedentes de líquido obtenido por secreción del pezón o bien a través de biopsia por aspiración con aguja fina (30).

Biopsia

El diagnóstico de cáncer de mama depende del análisis microscópico de células o tejido removido durante la biopsia. Cerca del 60% de las biopsias de pacientes con sospecha de cáncer resultan benignas y el 30% de las biopsias de pacientes con sospecha de lesión benigna resultan malignas. Esto confirma la necesidad de

realizar biopsia para confirmar el diagnóstico. La obtención de células para su análisis puede ser a través de:

1. Citología por aspiración con aguja fina
2. Biopsia con aguja larga
3. Biopsia abierta

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

Diagnóstico diferencial

Las lesiones que deben ser consideradas con más frecuencia en el diagnóstico diferencial son: displasia mamaria (enfermedad quística de la mama), fibroadenoma, papiloma intraductal, lipoma y necrosis grasa (31).

Estadificación

Actualmente la American Joint Comité on Cancer y la Internacional Union Against Cancer (Anexo 4) han acordado utilizar el sistema de estadificación TNM (Tumor, Nódulos linfáticos y Metastásis). El uso de este sistema pretende potenciar la comunicación entre investigadores y clínicos (32).

Tipos patológicos

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

Excepto para los cánceres *in situ*, los subtipos histológicos tienen leves diferencias en cuanto al pronóstico una vez que se ha estadificado la enfermedad. Se han

estudiado varios parámetros histológicos, tales como invasión de vasos sanguíneos, diferenciación tumoral, invasión de nódulos linfáticos mamarios y necrosis tumoral, sin embargo ninguno de ellos parece tener un valor pronóstico importante.

Aún cuando los cánceres no invasivos por definición se encuentran restringidos a la membrana basal de los ductos y no tienen la capacidad para extenderse o diseminarse, en pacientes cuyas biopsias muestran cáncer no invasivo intraductal, se ha encontrado en 1-3% de los casos metástasis de células invasivas malignas ductales a los nódulos linfáticos (33,34).

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

Tabla 2. Tipos histológicos de cáncer de mama

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

Receptores hormonales

La presencia o ausencia de receptores de estrógenos y progesterona en el citoplasma de las células tumorales es de gran importancia en el manejo de los pacientes con cáncer de mama. Los pacientes cuyos receptores son positivos tienen un pronóstico favorable en comparación con los que son receptores negativos. También, los receptores son de gran valor en la elección de terapia adyuvante y para el tratamiento de enfermedad avanzada. Cerca del 60% de los pacientes con

metástasis de cáncer de mama responderán a manipulación hormonal si sus tumores contienen células con receptores de estrógenos. Mientras que solo el 5% de los pacientes con metástasis y receptores negativos a estrógenos pueden ser tratados exitosamente en este contexto.

El estado de los receptores es valioso no solo en el manejo de la enfermedad metastásica sino también ayuda a seleccionar pacientes para terapia adyuvante. La terapia hormonal adyuvante (Tamoxifen) en tumores con receptor de hormonas positivo y con quimioterapia en tumores con receptor de hormonas negativo mejora considerablemente la tasa de supervivencia aún en ausencia de metástasis a nódulos linfáticos.

Los receptores de progesterona pueden ser un indicador aun más sensible que los receptores de estrógenos en pacientes que responderán a manipulación hormonal. Cerca del 80% de los pacientes con tumores metastásicos y con receptores positivos de progesterona mejoran considerablemente con la terapia hormonal adyuvante, sin embargo los receptores no tienen relación con la respuesta a quimioterapia (34-38).

Receptor HER-2/neu

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

Receptores HER-2/*neu* positivos se han asociado con un fenotipo agresivo de las células tumorales, así como con disminución en la tasa de supervivencia y una respuesta adecuada a Trastuzumab (39,40).

Tratamiento

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

quienes desarrollaron metástasis a distancia o quienes presentan cánceres locales irresecables.

Elección de la terapia primaria

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

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

Terapia conservadora

El tamaño tumoral es la mayor consideración para la conservación de la mama. Para llevar a cabo un resultado cosméticamente aceptable el paciente debe tener una mama de tamaño suficiente para escindir un tumor de 4 cm sin deformidad considerable. Un tumor multifocal es una contraindicación relativa para cirugía conservadora (41-43).

La disección axilar es valiosa en la prevención de recurrencias axilares, en estadificación del cáncer y en la elección del tratamiento, sin embargo en la actualidad se prefiere la biopsia de nódulo centinela como medio de estadificación. Incluso se han realizado múltiples investigaciones para identificar pacientes con alto riesgo de enfermedad metastásica a través de marcadores moleculares a diversos niveles (DNA, RNA y proteico) capaces de detectar micrometástasis en biopsias de médula ósea, ganglio centinela o sangre periférica (44).

Pronóstico

El estadio del cáncer de mama es el más directo indicador de pronóstico. Los pacientes con enfermedad localizada a la mama y sin evidencia de diseminación regional después de examen histopatológico de los nódulos linfáticos tienen el pronóstico más favorable. El estado de los nódulos linfáticos es el factor pronóstico más estudiado y correlacionado con la tasa de supervivencia en todos los tumores mamarios. Además el incremento en el número de nódulos axilares involucrados correlaciona directamente con las tasas de baja supervivencia (45).

El estado de los receptores de estrógeno y progesterona son variables pronósticas cuando los pacientes con tumores receptor hormonal negativos y sin evidencia de metástasis a nódulos linfáticos axilares tienen una alta tasa de recurrencia en comparación con los pacientes que presentan tumores receptor hormonal positivos y sin metástasis regional (35,36).

El subtipo histológico del cáncer de mama, por ejemplo medular, lobular y coloide parece tener poca significancia en el pronóstico ya que estos tumores son verdaderamente invasivos.

La citometría de flujo de células tumorales para analizar índice de DNA y frecuencia de la fase S ayudan en el pronóstico. Los tumores con marcada aneuploidía tienen un mal pronóstico.

La presencia de receptores HER-2/*neu* positivos se ha asociado con incremento de recurrencia y mal pronóstico (44).

Cuando el cáncer está localizado a la mama, sin evidencia de diseminación después de examen histopatológico, la tasa de curación clínica con el tratamiento estándar es de 75-90%. Excepciones a esta generalización son las relacionadas al contenido de receptores hormonales del tumor, tamaño tumoral, resistencia del hospedero o enfermedad asociada.

Los pacientes con tumores mamográficamente pequeños y receptores hormonales positivos y sin evidencia de diseminación ganglionar linfática tienen una tasa de

supervivencia de 90% a 5 años. Cuando los nódulos linfáticos se encuentran afectados, la tasa de supervivencia disminuye al 40-50% a 5 años y alrededor de 25% a 10 años (Tabla 3).

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

Estadio TNM	5 años	10 años
0	95	90
I	85	70
IIA	70	50
IIB	60	40
IIIA	55	30
IIIB	30	20
IV	5-10	2
Todos	65	30

En general el cáncer de mama parece ser de mayor malignidad en mujeres jóvenes que en adultas y esto puede estar en relación al hecho que pocas mujeres jóvenes tienen receptores hormonales positivos (42,45).

Metástasis

El potencial de crecimiento de los tumores y la resistencia del hospedero varían ampliamente de paciente a paciente y pueden ser alterados durante el curso de la enfermedad. El tiempo de duplicación de células cancerosas mamarias puede ir desde algunas semanas en lesiones de rápido crecimiento hasta varios años en lesiones de lento crecimiento. Asumiendo que la tasa de duplicación es constante y que la neoplasia se origina de una sola célula, un carcinoma con un tiempo de duplicación de 100 días puede no ser clínicamente detectable (1 cm.) por cerca de 8 años. Sin embargo los cánceres de crecimiento rápido tienen un curso preclínico mucho más corto y una gran tendencia a metastatizar en el tiempo en que la masa mamaria es descubierta.

La fase de crecimiento preclínico y la tendencia de los cánceres de mama a metastatizar han llevado a los clínicos a creer que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica al tiempo del diagnóstico. Aunque es cierto que las células cancerosas mamarias pudieron haberse liberado antes del diagnóstico hacia lugares distantes a través del sistema linfático o hematógeno, hay variaciones en la relación

tumor-hospedero que pueden evitar o propiciar el crecimiento de enfermedad metastásica en muchos pacientes. Está claro que histopatológicamente no todos los pacientes tienen enfermedad metastásica o sistémica al momento del diagnóstico, por lo que esto nuevamente invita a la búsqueda de marcadores moleculares que permitan identificar células neoplásicas en nódulos linfáticos, médula ósea o en sangre periférica (44).

Marcadores moleculares de metástasis

Avances en genómica, proteómica y patología molecular han generado muchos biomarcadores candidatos con potencial valor clínico. Su uso para pruebas en cáncer y personalización de la terapia en el momento del diagnóstico pueden mejorar considerablemente la supervivencia de los pacientes (44), sin embargo, la transmisión de la información obtenida en la investigación hacia la clínica ha sido más difícil de lo esperado. Entender cómo y cuando los biomarcadores pueden ser integrados dentro de la práctica clínica es crucial si se desea aplicarlo en la realidad. Se han realizado múltiples estudios de métodos moleculares y de biomarcadores para detectar células neoplásicas ocultas o no identificadas por estudios histopatológicos convencionales en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, como indicadores de diagnóstico, pronóstico y selección de tratamiento.

Dado que la metástasis es una cascada de pasos secuenciales en donde las células neoplásicas poseen múltiples alteraciones genéticas y las células tumorales pueden migrar a través de la membrana basal y matriz extracelular e introducirse y viajar a través del sistema linfático o sanguíneo a un nuevo sitio, se ha propuesto la vía hematogena como una fuente potencial para identificar células tumorales ocultas. Así, el desarrollo de una prueba no dolorosa, de fácil acceso, rápida y segura para detectar células mamarias neoplásicas metastásicas constituye una prioridad (44).

Se ha utilizado inmunohistoquímica y citometría de flujo para detectar células mamarias neoplásicas metastásicas, ambas con considerables limitaciones, sin embargo se ha demostrado que las técnicas moleculares son mucho más sensibles para la detección de un bajo número de células neoplásicas.

Una de las técnicas moleculares que ha demostrado ser sensible en la detección de una pequeña cantidad de células neoplásicas circulantes, llegando incluso a detectar 1 célula neoplásica circulante por 1×10^6 linfocitos en sangre periférica es la transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) (46, 47).

RT-PCR en tiempo real ha sido usado para la detección de marcadores específicos de células tumorales tanto en muestras de sangre periférica como de médula ósea de pacientes con cáncer de mama a fin de identificar la correlación de la expresión de los marcadores con el estadio clínico de la enfermedad (principalmente con nódulos linfáticos axilares positivos o negativos) así como con la supervivencia de los pacientes después del tratamiento.

Aun cuando se ha buscado la expresión de múltiples genes como marcadores moleculares para detectar células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica, tales como fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica (β -hCG), antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y mucina epitelial polimórfica (MUC-1), solo se ha logrado identificar a la citoqueratina 19 (CK-19) con alta sensibilidad y a la mamoglobina (hMAM) con alta especificidad como potenciales marcadores moleculares por RT-PCR en tiempo real, capaces de detectar células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica. También se ha propuesto en diversos estudios el gen de la MASPINA como marcador para micrometástasis en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama con una alta especificidad (47-48).

Uso de la tecnología molecular para identificar marcadores candidato

La identificación de marcadores moleculares por lo regular inicia a partir de patrones diferenciales de expresión génica en células neoplásicas procedentes de un tumor primario en diferentes estadios clínicos de la enfermedad mediante: 1) la técnica de microarreglos de expresión, 2) verificación a nivel de mRNA de la expresión de los genes candidato a través del diseño de oligonucleótidos específicos para su amplificación 3) corroboración de la expresión a nivel proteico y 4) evidencia científica de la participación de los genes candidato que en la fisiopatología del cáncer.

Una vez que se han identificado genes candidato como potenciales biomarcadores de células neoplásicas mamarias circulantes de cáncer en sangre periférica (en este caso de cáncer de mama) por su participación en la fisiopatología del cáncer así como por la identificación de patrones de expresión diferencial en tejido obtenido por biopsias de pacientes con diversos estadios de la enfermedad se procede a verificar que dichos genes no se encuentren expresados en sangre periférica de pacientes sanos así como las diferencias de expresión en sangre periférica del gen candidato en pacientes con cáncer de mama según estadios clínicos de la enfermedad (44).

III.ANTECEDENTES

En un estudio realizado en nuestra unidad de investigación a fin de identificar patrones diferenciales de expresión en un grupo de genes involucrados en apoptosis, se encontró por análisis de microarreglos en células tumorales mamarias provenientes de biopsias de pacientes con cáncer de mama en diversos estadios, principalmente en estadios II y III, sobre-expresión del gen *BIK/NBK* (fig. 1) (49).

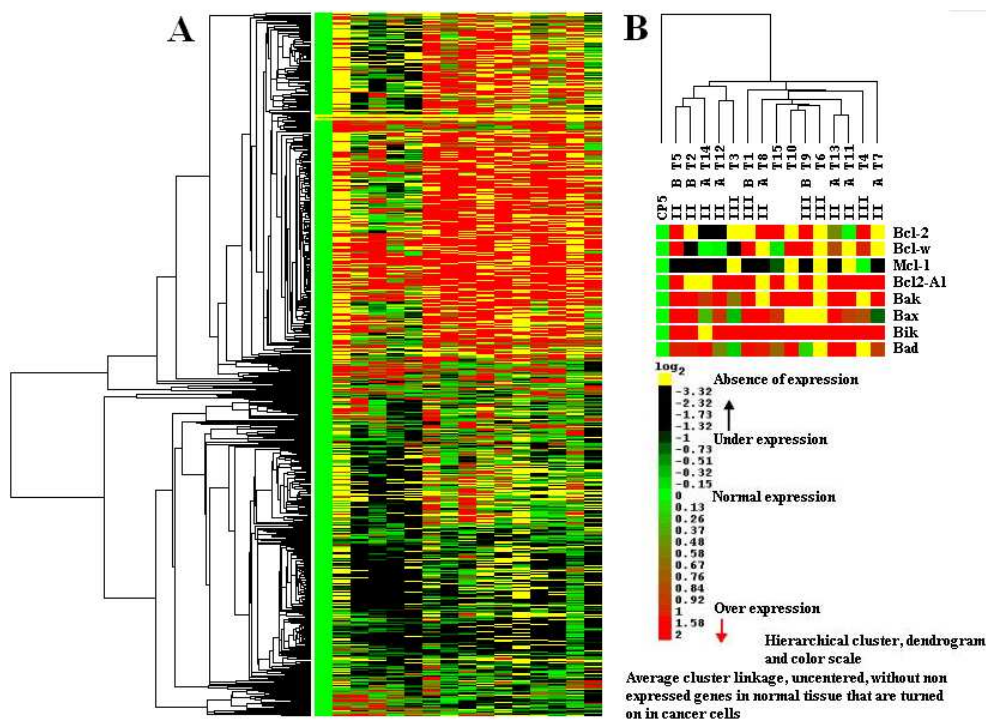


Fig. 1. A)Cluster y dendograma. Muestran los perfiles de expresión de 588 genes relacionados con Cáncer. **B)Dendograma, Genes de la familia BCL-2 y Escala de colores.** Muestran los subgrupos que se forman entre muestras; se ejemplifica el comportamiento de 8 genes de la familia BCL-2 relacionados con apoptosis y se muestra la escala de colores utilizada para identificar el estado de expresión de los genes.

GEN *BIK/NBK*

El gen humano *BIK/NBK* codifica una proteína de 160 aminoácidos con función proapoptótica denominada BIK. La proteína BIK cuenta con un dominio funcional denominado BH3 y contiene un dominio transmembranal c-terminal (50,51). Se ha localizado este gen en 22q13.3, consta de 5 exones y 4 intrones y se extiende cerca de 19 Kb. El dominio transduccional y el dominio BH3 fueron localizados en el exon 2 y 3 respectivamente.

BIK tiene fuerte actividad apoptótica en un gran número de tipos celulares *in vitro*. Se ha reportado su participación en apoptosis en células de melanoma humano (52), y se ha encontrado mutado en cáncer glial, colorectal, mieloma y linfoma de células B (53-56). El dominio BH3 juega un papel central en inducir la muerte celular y dimerización proteica. Al parecer BIK induce apoptosis por la vía mitocondrial (57-59).

Dadas su propiedades proapoptóticas descritas, a la fecha se han realizado estudios *in vitro* a fin de identificar sustancias que aumenten los niveles de expresión del gen *BIK/NBK* encontrándose que diversos inhibidores del proteasoma logran incrementar su expresión (60-62).

Por otro lado, el gen *BIK/NBK* ha sido introducido en diversos vectores a fin de determinar su utilidad en terapia génica, observándose que las células tumorales disminuyen su índice de crecimiento y proliferación (63,64).

Con respecto a la expresión del gen *BIK/NBK* son pocos los datos publicados. En ratones se ha reportado expresión del gen homólogo a *BIK/NBK* en diversas células hematopoyéticas y en células epiteliales (65). En estudios de tejidos en humano, Verma y colaboradores reportaron expresión del gen *BIK/NBK* en corazón y músculo esquelético (66), sin embargo, Daniel PT y colaboradores (67) realizaron estudios en donde se mostró que el gen *BIK/NBK* tiene una distribución de expresión restringida, siendo mayormente detectada en células epiteliales. En su estudio demostraron altos niveles de expresión del tejido en riñones, páncreas y niveles bajos en placenta, pulmón, hígado, próstata y testículos, mientras que, no se encontró

expresión del gen en corazón, cerebro, músculo esquelético, bazo, timo, ovario, intestino delgado, colón y linfocitos de sangre periférica.

Se ha demostrado también que el mRNA del gen *BIK/NBK* está expresado ectópicamente en algunas líneas celulares de tumores, por ejemplo fue detectado en células EBV (Virus de Epstein Barr) positivas tipo III de Linfoma de Burkitt y SW480 de adenocarcinoma de colón. La expresión del gen *BIK/NBK* fue detectada en epitelio pero no en el compartimiento linfoide. Dadas las propiedades pro-apoptóticas de BIK, éste debería estar también involucrado en el mantenimiento de la homeostasis tejido específico en tejidos del adulto (51).

Hur y colaboradores reportaron que el mRNA de *BIK/NBK* y su proteína fueron inducidos intensamente por privación estrogénica o tratamiento con el anti-estrogénico Fulvestrant en una sublínea de células de cáncer de mama MCF-7 denominada MCF-7/BUS (caracterizada por su crecimiento dependiente de la dosis de estrógenos). La inducción de *BIK/NBK* ocurrió antes de la muerte celular por apoptosis, misma que podía ser bloqueada por zVAD.FMK (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp [OMe] fluoromethylketone), un inhibidor de pancaspasas. La cantidad de proteínas relacionadas a la familia de BCL-2, tales como BCL-2 propiamente, BCL-xL(BCL2-like 1) o BAX (BCL2-associated X protein) mostró cambios marginales en presencia o ausencia de estrógenos o anti-estrógenos. La supresión del gen *BIK/NBK* por un siRNA pequeño, bloqueo en forma efectiva la apoptosis inducida por Fulvestrant en células cancerosas mamarias. Sus resultados indican que *BIK/NBK* es inducido en células MCF-7/BUS en ausencia de la señalización por estrógenos y juega un papel importante en la apoptosis provocada por anti-estrógenos en células de cáncer de mama (68)

ESTRÓGENOS

Existe evidencia que los estrógenos son requeridos para el desarrollo, crecimiento, control y diferenciación del epitelio mamario normal, sin embargo también se ha descrito que los estrógenos son mitógenos poderosos con participación en la iniciación y progresión del cáncer de mama (69-73)

También se ha reportado la participación de los estrógenos tanto en la proliferación celular como en la supervivencia de células de cáncer de mama positivas a

receptores de estrógenos alfa (71). Incluso, se ha demostrado la participación de los estrógenos en la supresión de apoptosis (74,75).

La apoptosis puede ser iniciada por una gran variedad de estímulos, tales como, señales de desarrollo, daño celular y alteración del ciclo celular (76). Se han identificado un gran número de factores clave que participan en la regulación, coordinación y ejecución de apoptosis, entre ellos, la familia de proteínas BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2), la cual juega un papel crítico como regulador de apoptosis al inhibir o promover la muerte celular (77)

En diversos estudios se ha evaluado la regulación de apoptosis por estrógenos en células de cáncer de mama demostrando la importancia de la vía apoptótica mitocondrial o vía intrínseca, la cual involucra a la familia de proteínas BCL-2 (74, 78-83).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a la importante participación del gen *BIK/NBK* en la regulación génica en cáncer de mama y dada la probabilidad de que la expresión del gen *BIK/NBK* pudiera constituir un marcador de micrometástasis en sangre periférica de mujeres con cáncer de mama, inicialmente determinamos la expresión de *BIK/NBK* mediante RT-PCR en sangre periférica de mujeres con y sin cáncer de mama, para demostrar que el marcador propuesto no estaba expresado o se expresaba diferencialmente en ambos grupos de individuos.

Posteriormente efectuamos la cuantificación relativa de *BIK/NBK* mediante RT-qPCR, una metodología con alta sensibilidad, en sangre periférica de otro grupo de mujeres con cáncer de mama esporádico clasificadas por estadios clínicos para identificar si existían diferencias en la expresión.

Por último efectuamos la cuantificación relativa de la expresión de *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX (Light Upon eXtension) Fluorogenic Primers, en sangre periférica de un tercer grupo de mujeres con y sin cáncer de mama, en donde además, a las mujeres con cáncer de mama se efectuó la correlación de la expresión de *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico con la expresión de *BIK/NBK*

en células circulantes en sangre periférica, y se validaron los resultados mediante la determinación de la expresión de los genes CK-19 y hMAM.

Además se efectuó la correlación de la expresión a nivel mRNA del gen *BIK/NBK* con la expresión a nivel proteína de los receptores de ER α (receptores de estrógenos alfa) y progesterona en tejido mamario neoplásico.

IV.MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

Se analizaron un total de 85 muestras. Todas las participantes fueron mexicanas en al menos tres generaciones previas y las pacientes con cáncer de mama fueron obtenidas por muestreo de casos consecutivos del Servicio de Tumores de mama, del Hospital de Oncología del CMN SXXI, IMSS.

En el primer grupo se incluyeron muestras de sangre periférica de 28 mujeres sin cáncer de mama y sin antecedentes personales o familiares de cáncer y fueron comparadas con muestras de sangre periférica de 11 mujeres con cáncer de mama esporádico, sin antecedentes heredofamiliares de cáncer o de tumor primario de origen diferente al de la mama y sin tratamiento al momento de la toma de la muestra.

En el segundo grupo se incluyeron muestras de sangre periférica de 29 mujeres con cáncer de mama esporádico clasificadas por estadios clínicos, sin antecedentes heredofamiliares de cáncer o de tumor primario diferente al de la mama y sin tratamiento al momento de la toma de la muestra.

En el tercer grupo se incluyeron muestras de sangre periférica de 6 mujeres sin cáncer de mama y sin antecedentes personales o familiares de cáncer y muestras de sangre periférica así como de tejido mamario neoplásico de 11 mujeres con cáncer de mama sin antecedentes heredofamiliares de cáncer o de tumor primario diferente al de la mama y sin tratamiento al momento de la toma de la muestra.

CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA.

Cabe mencionar que para los primeros dos grupos no se efectuó cálculo de tamaño de muestra debido a que se trataba de un estudio exploratorio inicial. Sin embargo

para el caso del tercer grupo se efectuó un cálculo de tamaño de muestra basado en los siguientes supuestos:

La magnitud de la correlación a encontrar (ρ) en base a estudios previos en donde hay alta correlación entre los marcadores moleculares identificados en tejido mamario neoplásico y en células circulantes en sangre periférica, sobre todo cuando estos marcadores no se expresan en forma habitual en células del torrente sanguíneo fue de $\rho= 0.70$ entre las dos variables, indicando así que a mayor expresión de los genes *BIK/NBK*, *hMAM* y *CK-19* en tejido tumoral mamario, también existiría mayor expresión de estos en células circulantes en sangre periférica dada la diseminación de las células neoplásicas mamarias a través del torrente sanguíneo (micrometástasis).

Para la correlación de *BIK/NBK* y receptores de estrógenos alfa y progesterona en tejido mamario neoplásico también se esperaba encontrar una $\rho=0.70$.

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

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

Sustituyendo los valores y efectuando el cálculo se obtuvo una $n= 11$.

ASPECTOS ÉTICOS

Se trató de un estudio con riesgo mínimo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana en materia de Investigación en Salud, dado que únicamente se utilizaron 8 mL de sangre periférica en una sola toma así como tejido tumoral mamario proveniente de la biopsia realizada como procedimiento de rutina para la confirmación diagnóstica de cáncer de mama en mujeres con alta sospecha del mismo. El protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el número 2007-785-063. Todas las participantes aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).

COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Sangre

Se colectaron 8 mL de sangre venosa de cada una de las participantes en dos tubos BD Vacutainer K3 EDTA. Para evitar coleccionar células epiteliales de la piel durante la venopunción se descartó el primer tubo. Se separaron las células blancas mediante gradiente con Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) de acuerdo a instrucciones del fabricante (Anexo 2).

Tejido mamario

Se colectaron muestras de tejido mamario neoplásico con el sistema *Vacora Breast Biopsy* (C.R. Bard, Inc), a través de la biopsia realizada a 11 mujeres para la confirmación diagnóstica histopatológica inicial. Las muestras fueron colocadas en nitrógeno líquido para su transporte y se seleccionaron para su análisis por confirmación histopatológica de cáncer de mama por dos patólogos, demostrando que las muestras contenían al menos 70% de células tumorales.

EXTRACCIÓN DE RNA

Muestras de sangre

Se efectuó la extracción de RNA usando RNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 3) y se disolvió en agua libre de RNasa para una concentración final de 100ng/ μ L. El RNA total extraído se almacenó a -70°C hasta su uso. Se confirmó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa y la cuantificación se realizó con espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific).

Muestras de tejido

Se pesaron 30 mg de tejido, se colocaron en mortero con nitrógeno líquido y se molieron con pistilo, posteriormente se colocaron en tubo Eppendorf de 1.5 mL libre de RNasa previamente enfriado en nitrógeno líquido. Se efectuó la extracción de RNA de acuerdo a las instrucciones de RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y se disolvió en agua libre de RNasa para una concentración final de 100ng/ μ L. El RNA extraído se almacenó a -70°C hasta su uso. Se confirmó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa y la cuantificación se realizó con espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific).

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 100 ng de RNA total, usando Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) y oligo-dT de acuerdo a instrucciones del fabricante (Anexo 4). El cDNA fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

Ensayo de PCR punto final

Se diseñaron oligonucleótidos para el gen control *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysklik) usando la secuencia reportada en el Gen Bank con número de acceso NM 0000194. Forward 5'AATTATGGACAGGACTGAACGTC3', y Reverse 5'CTTGCTGGTGAAAAGGACCCCACG3', con un fragmento de amplificación esperado de 387 pb.

Se diseñaron oligonucleótidos para el gen blanco *BIK/NBK* con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysklik), usando la secuencia reportada en el Gen Bank con número de acceso NCBI U34584. Forward 5'GAGACATCTTGATGGAGACC3' y reverse 5'ACATCAGGGATGTTCTTAGA3', con un fragmento de amplificación esperado de 290 pb.

La reacción de PCR fue realizada en tubos separados para amplificar el gen control y el gen blanco en cada una de las muestras, con un volumen final de 20 µL que contenía 1 µL de oligonucleótido sentido 20 pmol y 1 µL de oligonucleótido antisentido 20 pmol, 2 µL de amortiguador 10X, 1 µL de MgCl₂ 50 mM (para *HPRT1*) y 0.5 µL de MgCl₂ 50 mM (para *BIK/NBK*), 2 µL de DNTPs 2mM, 0.2 µL de Taq polimerasa 0.5 UI y 1 µL de cDNA.

La amplificación se llevó a cabo en termociclador Gene Amp PCR System 9700, con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (94°C durante 5 minutos), 45 ciclos con tres pasos, desnaturalización (94°C durante 20 segundos), alineamiento (58°C para *HPRT1* y 55°C para *BIK/NBK* durante 1 minuto) y elongación (72°C durante 1 minuto) y fase de elongación final (72°C durante 7 minutos).

Posteriormente los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como control negativo se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total de la línea celular MCF-7 el cuál no expresó el gen *BIK/NBK* y como control positivo se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de tejido tumoral renal el cuál expresó el gen *BIK/NBK*.

Ensayo de PCR en tiempo real

Se utilizaron los mismos oligonucleótidos mencionados en el apartado previo y fue realizada en tubos separados para el gen control y el gen de interés, con un volumen final de 25 μ L que contenía 1 μ L de oligonucleótido sentido 10 μ M y 1 μ L de oligonucleótido antisentido 10 μ M, 2 μ L de MgCl₂ 50mM (para *HPRT1*) y 3 μ L de MgCl₂ 50mM (para *BIK/NBK*), 12.5 μ L de Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen Life Technologies) y 1 μ L de cDNA.

La amplificación se llevó a cabo en instrumento de qPCR Rotor-Gene 3000 (Corbett Research), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (94 $^{\circ}$ C durante 5 minutos), 45 ciclos con tres pasos, desnaturalización (94 $^{\circ}$ C durante 20 segundos), alineamiento (58 $^{\circ}$ C para *HPRT1* y 56 $^{\circ}$ C para *BIK/NBK* durante 59 segundos) y elongación (72 $^{\circ}$ C durante 59 segundos). Análisis de curvas meelting (67-95 $^{\circ}$ C, 1 $^{\circ}$ C por cada paso, 45 segundos en el primer paso y esperar 5 segundos en cada paso).

Como control negativo se utilizó agua en lugar de cDNA y como control positivo se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de tejido tumoral mamario el cuál expresó el gen *BIK/NBK*.

Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Se efectuó cuantificación relativa mediante el software Rotor-Gene 6.0.19 (Corbett Research) por el método Δ_{CT} (85).

Ensayo de PCR en tiempo real con LUX Fluorogenic Primers

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados con el programa D-LUX Designer (Invitrogen life Technologies) usando las secuencias reportadas en GenBank como sigue: Para el gen control *HPRT1* GCTGAGGATTTGGAAAGGGTGT y JOE-labeled primer cgagatCCATCTCCTTCATCACATCTcG. Para el gen blanco *BIK/NBK*

CCTGAGGCTCACGTCCATCTC and FAM-labeled primer
cgaagtGGACCCTATGGAGGACTTcG.

Además se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen CK19
CCCGCGACTACAGCCACTACT and FAM-labeled primer
cgaacTCCGTCTCAAACCTTGGTTcG y para el gen hMAM
CACTTGTGGATTGATTGTCTTGGA and FAM-labeled primer
gtagcaCCCTCTCCCAGCACTGCCcAC, ambos reportados con mayor sensibilidad y
especificidad en la detección de células mamarias cancerosas en sangre periférica y
que utilizamos para validar los resultados en algunas de las muestras.

Se realizaron ensayos de qPCR siguiendo las instrucciones del manual Platinum
Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen life Technologies) y de LUX (Light Upon
eXtension) Fluorogenic Primers Instrument Protocols (Invitrogen life Technologies)
para el instrumento de qPCR Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Se efectuó PCR de todas las muestras en reacción diplex con el gen control *HPRT1*
para el gen *BIK/NBK* y, de algunas de las muestras para los genes *CK19* y *hMAM*,
con un volumen final de 25µL que contenía 0.5µL de LUX labeled primer 10µM y
0.5µL de LUX unlabeled primer 10µM del gen control y 1µL de LUX labeled primer
10µM y 1µL de LUX unlabeled primer 10µM del gen de interés, 1.5µL de MgCl₂
50mM, 12.5 µL de Platinum qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen Life Technologies) y 2
µL de cDNA.

Como control negativo se utilizó agua en lugar de cDNA y como control positivo se
utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de tejido tumoral mamario el
cuál expresó el gen *BIK/NBK*.

La amplificación se efectuó en instrumento de qPCR Rotor-Gene 3000 (Corbett
Research) con las siguientes condiciones: Reacción UDG (uracil DNA glycosylase-
mediated carry-over prevention) 50°C por 2 minutos, Inactivación/desnaturalización
del templado UDG 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de tres segmentos de amplificación
(5 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C con adquisición y 10 segundos a 72°C) y
un ciclo de análisis de curva de desnaturalización (“melting”) de 60-95°C con un

tiempo de elevación de 1°C/paso (esperar 60 segundos en el primer paso y 5 segundos/pasos subsecuentes).

Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Se efectuó cuantificación relativa mediante el software Rotor-Gene 6.0.19 (Corbett Research) por el método Δ_{CT} .

Inmunohistoquímica

Para la identificación de la expresión de los ER α , se utilizó el método del complejo estreptoavidina-biotina peroxidasa (DAKO LSAB + System- HRP Kit, Carpentry, CA, USA) con diaminobenzidina como cromógeno. Los epítopes fueron recuperados por autoclave en 10 mM de amortiguador de ácido cítrico, pH 6.1 por 2 minutos. Se uso un anticuerpo primario policlonal para ER α en un suero bovino al 1% albumina-fosfato amortiguado en solución salina (BSA-PBS). Los tejidos de cáncer de mama fueron fijados en formalina por 24-72 hrs y posteriormente embebidos en parafina y diversas secciones fueron evaluadas para la selección y corte de blancos (Anexo 5).

Análisis estadístico

En el primer grupo, la expresión del gen *BIK/NBK* fue medida en escala nominal dicotómica por la presencia o ausencia del fragmento esperado de amplificación en gel de agarosa. Se aplicó prueba exacta de Fisher para determinar diferencias en la expresión del gen *BIK/NBK* en las mujeres con y sin cáncer de mama.

En el segundo grupo, la expresión del gen *BIK/NBK* fue medida en escala cuantitativa continua por el método Δ_{CT} . Se aplicó prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencias significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* en las mujeres con cáncer de mama clasificadas por estadios clínicos.

En el tercer grupo la expresión del gen *BIK/NBK* fue medida en escala cuantitativa continua por el método Δ_{CT} . Se aplicó prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias en la expresión del gen *BIK/NBK* en las mujeres con y sin cáncer de mama; y prueba de correlación de Spearman para determinar la correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* en sangre periférica y tejido mamario canceroso de mujeres con cáncer de mama.

Se aplicó prueba de correlación de Spearman para determinar la correlación de la expresión a nivel mRNA del gen *BIK/NBK* con la expresión a nivel proteína de los receptores de estrógeno alfa y progesterona en tejido mamario neoplásico.

V.RESULTADOS

PRIMER GRUPO

Expresión del gen BIK/NBK mediante RT-PCR en sangre de mujeres con y sin cáncer de mama.

Las 28 mujeres sin cáncer de mama donadoras de muestras de sangre periférica se encontraban en un rango de edad de 23-52 años, promedio de 33.96 años y desviación estándar ± 8.30 años (Figura 2).

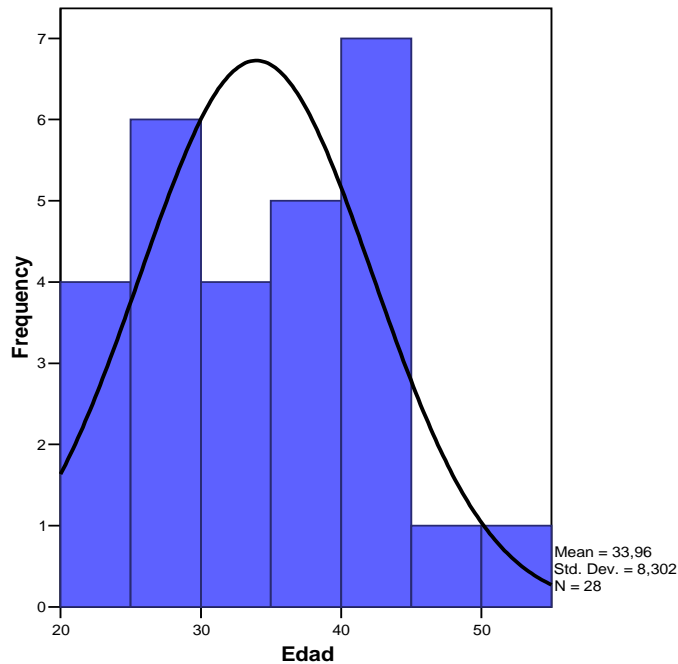


Figura 2. Distribución de la variable edad. Histograma de la variable edad de 28 mujeres sin cáncer de mama pertenecientes al primer grupo de comparación.

En cuanto a las 11 mujeres con cáncer de mama donadoras de muestras de sangre periférica se encontraban en un rango de edad de 31-82 años, promedio de 58.36 años y desviación estándar de 17.59 años (Figura 3).

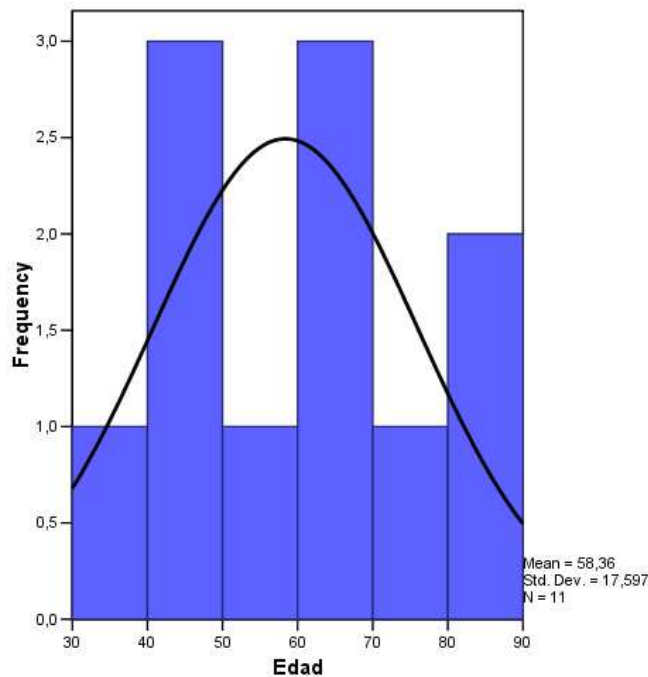


Figura 3. Distribución de la variable edad. Histograma de la variable edad de 11 mujeres con cáncer de mama pertenecientes al primer grupo de comparación.

Las 11 mujeres con cáncer de mama del primer grupo de comparación fueron clasificadas por el análisis histopatológico como cáncer ductal invasivo. La figura 4 muestra el porcentaje de pacientes con cáncer de mama que se encontraba en cada uno de los estadios clínicos.

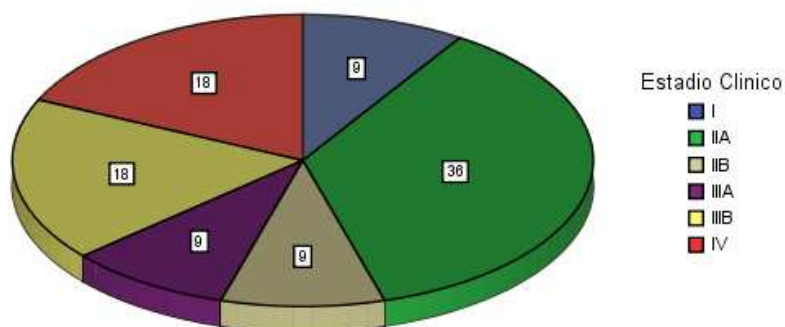


Figura 4. Estadio clínico de cáncer de mama. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estadio clínico, en el primer grupo de comparación.

Las 39 muestras de sangre, incluyendo las provenientes de mujeres con y sin cáncer de mama amplificaron el fragmento esperado de 387 pb correspondiente al gen control *HPRT1*, sin embargo, ninguna de las 28 muestras de sangre provenientes de mujeres sin cáncer de mama amplificó el fragmento esperado de 289 pb, correspondiente al gen *BIK/NBK* (Figura 5 y 6).

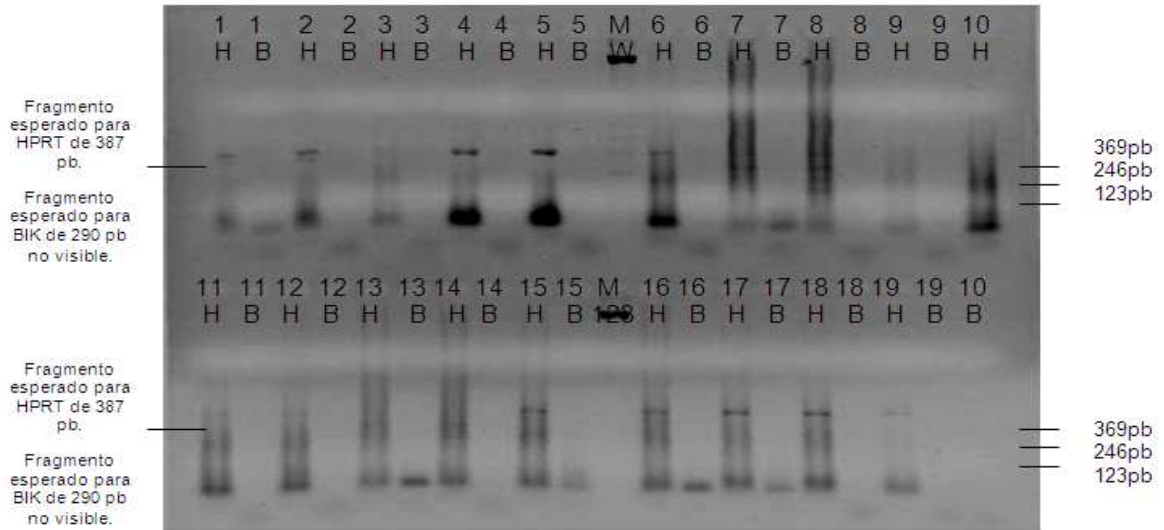


Figura 5. Expresión del gen *HPRT1* y *BIK/NBK* mediante RT-PCR en muestras de sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama. Gel de agarosa al 1% para *HPRT1* con un fragmento esperado de 387 pb (H) y *BIK/NBK* con un fragmento esperado de 290 pb en las muestras de sangre 1-19 de mujeres sin cáncer de mama del primer grupo de comparación. Marcador de peso molecular de 123pb (MW).

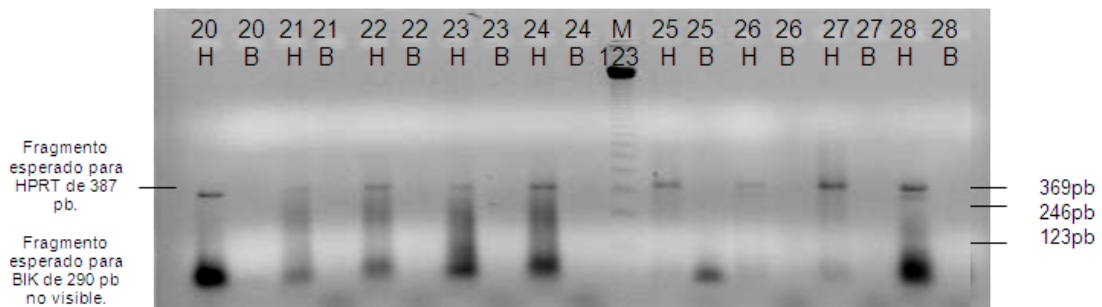


Figura 6. Expresión del gen *HPRT1* y *BIK/NBK* mediante RT-PCR en muestras de sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama. Gel de agarosa al 1% para *HPRT1* con un fragmento esperado de 387 pb (H) y *BIK/NBK* con un fragmento esperado de 290 pb en las muestras de sangre 20-28 de mujeres sin cáncer de mama del primer grupo de comparación. Marcador de peso molecular de 123pb (MW).

En el caso de las muestras de sangre de mujeres con cáncer de mama, 10 no amplificaron el fragmento esperado para el gen *BIK/NBK* (Figura 7 y 8).

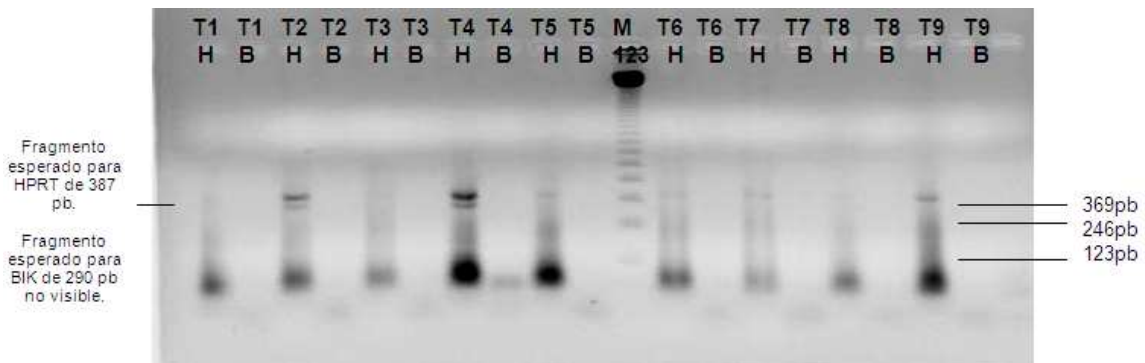


Figura 7. Expresión del gen *HPRT1* y *BIK/NBK* mediante RT-PCR en muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama. Gel de agarosa al 1% para *HPRT1* con un fragmento esperado de 387 pb (H) y *BIK/NBK* con un fragmento esperado de 290 pb en las muestras de sangre 1-9 de mujeres con cáncer de mama del primer grupo de comparación. Marcador de peso molecular de 123pb (MW).

En la figura 8 además se observa el fragmento de amplificación de 290 pb correspondiente al gen *BIK/NBK* en solo una de las muestras de sangre proveniente de una mujer con cáncer de mama (por duplicado) y en una muestra control positivo de tejido tumoral renal (el cuál se sabe expresa el gen *BIK/NBK*).

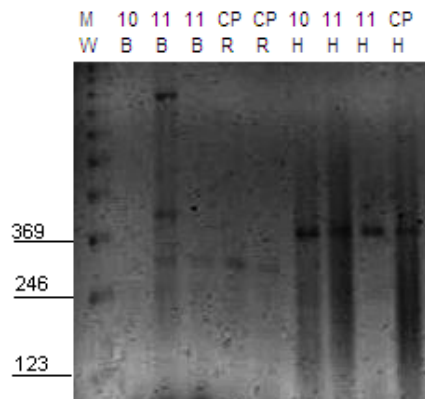


Figura 8. Expresión del gen *HPRT1* y *BIK/NBK* mediante RT-PCR en muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama. Gel de agarosa al 1% para *HPRT1* con un fragmento esperado de 387 pb (H) y *BIK/NBK* con un fragmento esperado de 290 pb en las muestras de sangre 10 y 11 de mujeres con cáncer de mama y en el control positivo proveniente de un tumor renal el cuál amplifica el gen *BIK/NBK* (CP). La muestra 11 y CP se observan por duplicado. Marcador de peso molecular de 123pb (MW).

Al aplicar la prueba exacta de Fisher no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.282$) en la expresión del gen *BIK/NBK* entre las 28 muestras de sangre provenientes de mujeres sin cáncer de mama y las 11 muestras de sangre provenientes de mujeres con cáncer de mama (Figura 9).

Sano * Expresion Crosstabulation

Count

		Expresion		Total
		NO EXPRESADO	EXPRESADO	
Sano	NO	10	1	11
	SI	28	0	28
Total		38	1	39

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Fisher's Exact Test				,282	,282
N of Valid Cases	39				

Figura 9. Prueba exacta de Fisher. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* en las muestras provenientes de mujeres con y sin cáncer de mama del primer grupo de comparación ($p= 0.282$)

SEGUNDO GRUPO

Expresión del gen BIK/NBK mediante RT-PCR en tiempo real en sangre de mujeres con cáncer de mama en diferentes estadios clínicos.

Las 29 muestras de sangre periférica provenían de mujeres con cáncer de mama en un rango de edad de 31-80 años, promedio de 56.69 años y desviación estándar de ± 13.56 años (Figura 10).

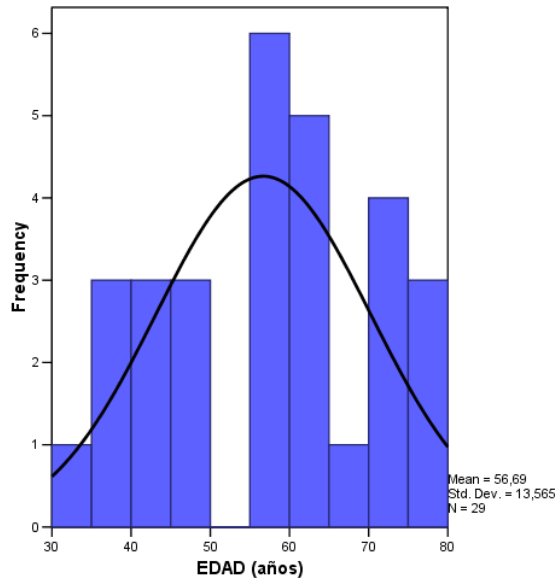


Figura 10. Distribución de la variable edad. Histograma de la variable edad de 29 mujeres con cáncer de mama pertenecientes al segundo grupo de comparación.

El 89% de las 29 mujeres con cáncer de mama donadoras de las muestras de sangre periférica fueron clasificadas por análisis histopatológico como carcinoma ductal (Figura 11).

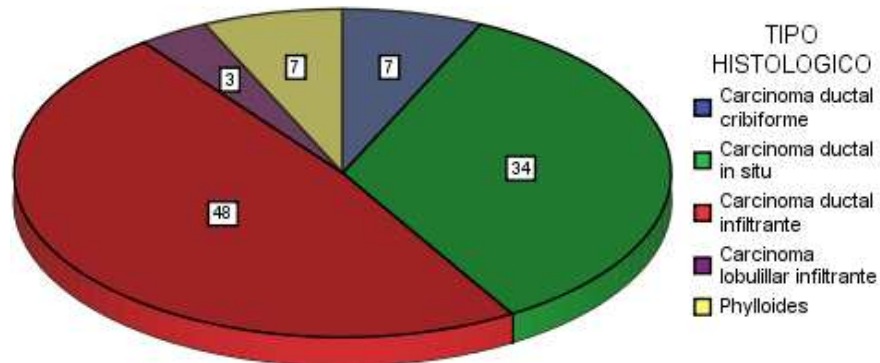


Figura 11. Tipo histopatológico de cáncer de mama. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al tipo histopatológico, en el segundo grupo de comparación.

En la figura 12 se observa el porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estadio clínico en que fueron clasificadas.

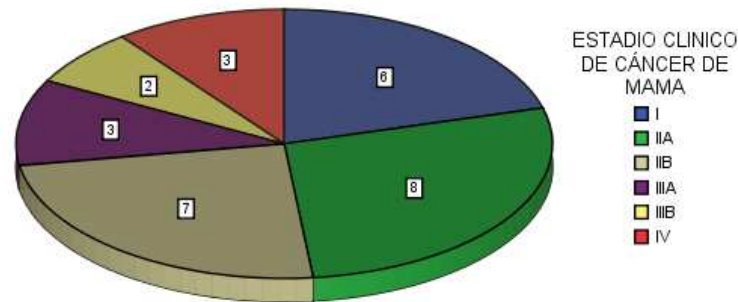


Figura 12. Estadio clínico de cáncer de mama. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estadio clínico, en el segundo grupo de comparación.

Las 29 muestras de sangre provenientes de mujeres con cáncer de mama en diversos estadios clínicos de la enfermedad mostraron amplificación del gen control *HPRT1* (Figura 13) y del gen *BIK/NBK* (Figura 14).

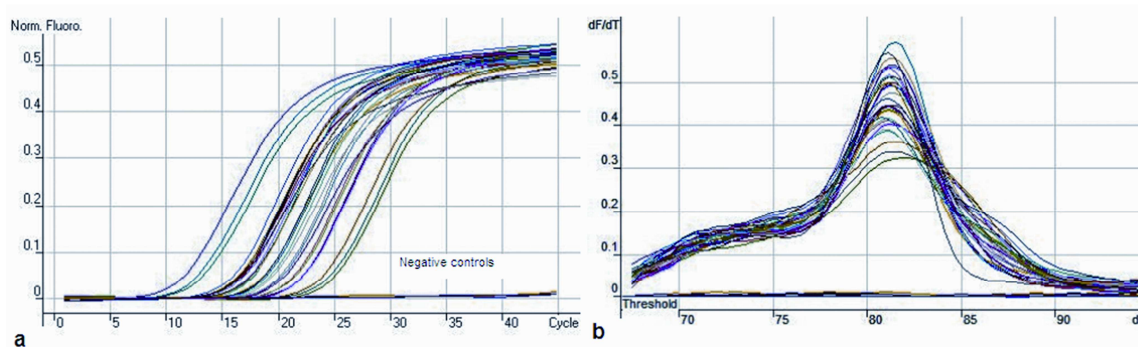


Figura 13. Expresión del gen *HPRT1* mediante RT-qPCR en 29 muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama. **a)** Curvas de amplificación del gen control *HPRT1* y tres controles negativos (sin cDNA). La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen control *HPRT1* y tres controles negativos. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas [$2dF/dT$] vs T . Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

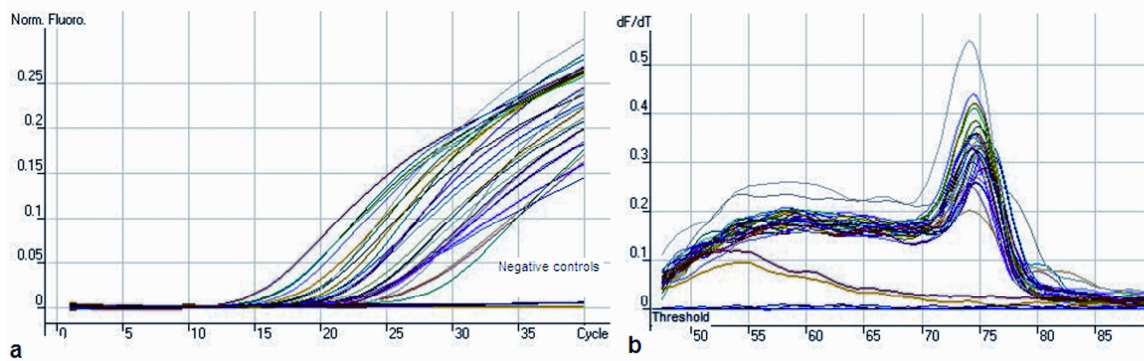


Figura 14. Expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR en 29 muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama. a) Curvas de amplificación del gen *BIK/NBK* y tres controles negativos (sin cDNA). La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen *BIK/NBK* y tres controles negativos. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas [(2dF/dT) vs T]. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

El análisis de la expresión del gen *BIK/NBK* se realizó mediante el método Δ_{CT} y posteriormente se efectuó la prueba de Kruskal Wallis, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* por estadio clínico ($p=0.469$).

Ranks

	ESTADIO CLINICO DE	N	Mean Rank
dosalamenosdelta	I	6	11,17
	IIA	8	19,50
	IIB	7	15,07
	IIIA	3	16,00
	IIIB	2	9,00
	IV	3	13,50
	Total	29	

Test Statistics^{a,b}

	dosalame nosdelta
Chi-Square	4,580
df	5
Asymp. Sig.	,469

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: ESTADIO CLINICO DE CÁNCER DE MAMA

Figura 15. Prueba de Kruskal Wallis. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* en las muestras provenientes de mujeres con cáncer de mama en función del estadio clínico ($p=0.469$).

TERCER GRUPO

Expresión del gen BIK/NBK mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers, en sangre de mujeres con y sin cáncer de mama

Las 6 mujeres sin cáncer de mama donadoras de muestras de sangre periférica se encontraban en un rango de edad de 28-60 años, promedio de 39.33 años y desviación estándar de ± 11.86 años (Figura 16).

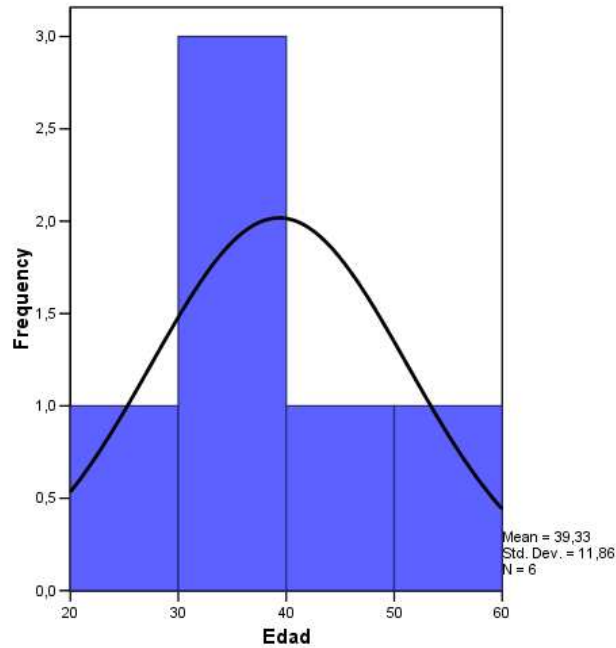


Figura 16. Distribución de la variable edad. Histograma de la variable edad de 6 mujeres sin cáncer de mama pertenecientes al tercer grupo de comparación.

En cuanto a las 11 mujeres con cáncer de mama donadoras de muestras de sangre periférica se encontraban en un rango de edad de 34-83 años, promedio de 59.09 años y desviación estándar de ± 14.83 años) (Figura 17).

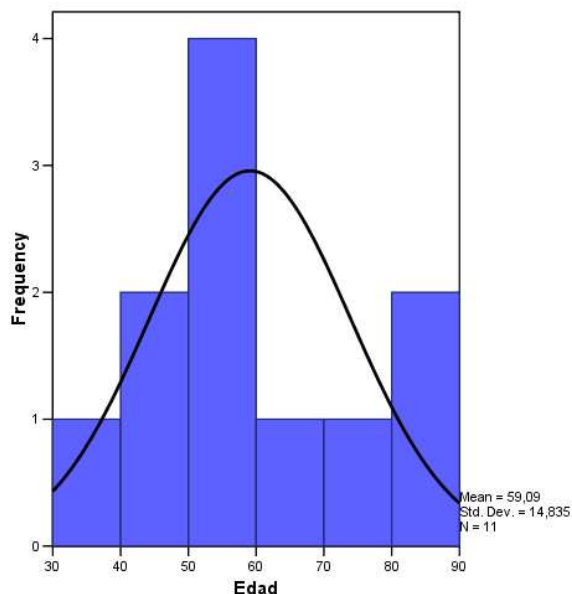


Figura 17. Distribución de la variable edad. Histograma de la variable edad de 11 mujeres con cáncer de mama pertenecientes al tercer grupo de comparación.

El 91% de las 6 mujeres con cáncer de mama donadoras de las muestras de sangre periférica fueron clasificadas por análisis histopatológico como carcinoma ductal infiltrante (Figura 18).

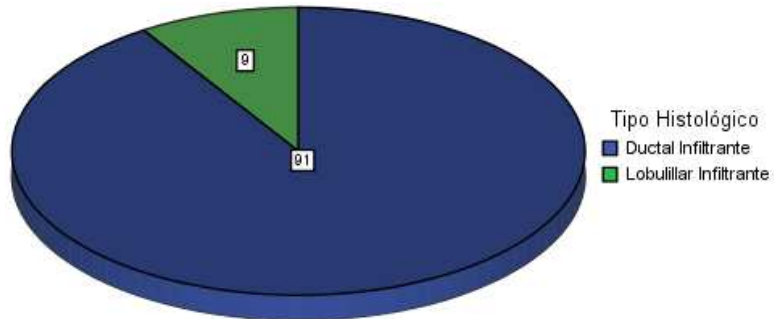


Figura 18. Tipo histopatológico de cáncer de mama. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al tipo histopatológico, en el tercer grupo de comparación.

En la figura 19 se observa el porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estadio clínico.

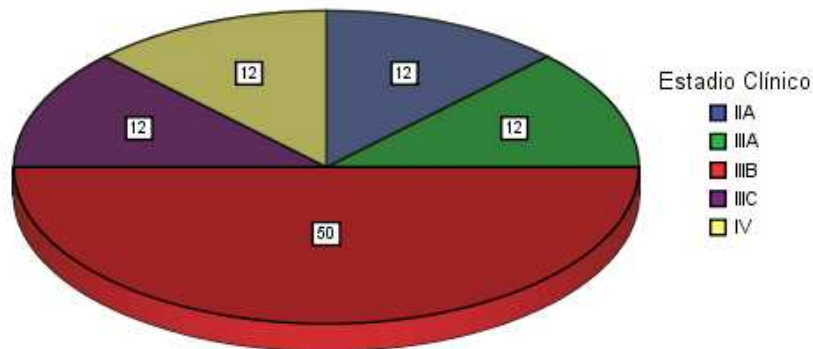


Figura 19. Estadio clínico de cáncer de mama. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estadio clínico, en el tercer grupo de comparación.

Las 17 muestras de sangre, incluyendo las provenientes de mujeres con y sin cáncer de mama mostraron amplificación del gen *HPRT1* (Figura 20) y del gen *BIK/NBK* (Figura 21).

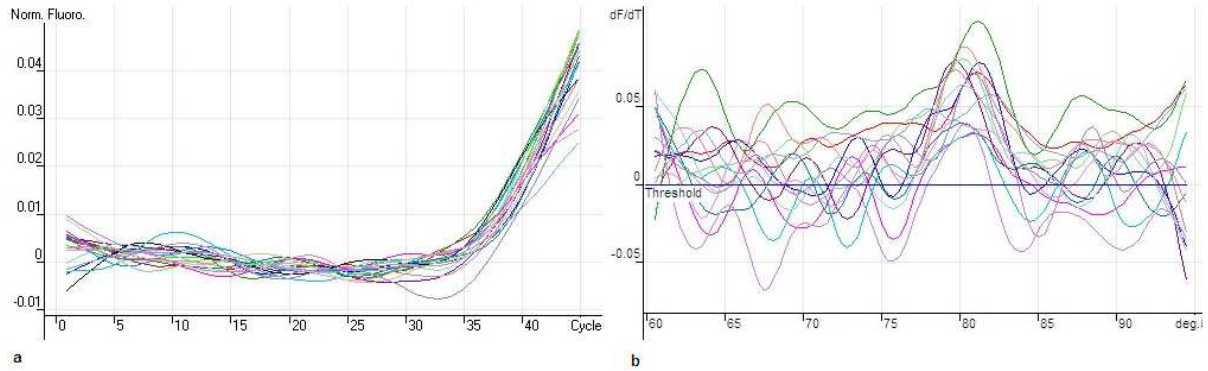


Figura 20. Expresión del gen *HPRT1* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 17 muestras de sangre periférica de mujeres con y sin cáncer de mama. a) Curvas de amplificación del gen control *HPRT1*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen control *HPRT1*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas $[(2dF/dT) vs T]$. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

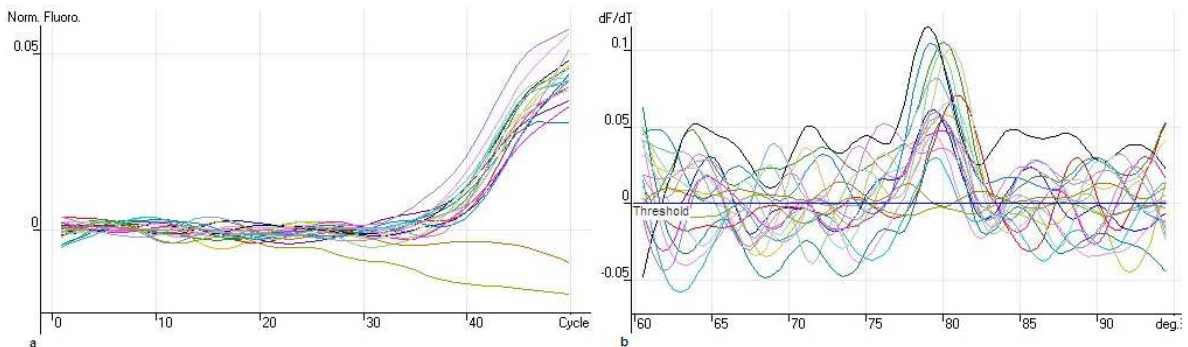


Figura 21. Expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 17 muestras de sangre periférica de mujeres con y sin cáncer de mama. a) Curvas de amplificación del gen control *BIK/NBK*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen control *BIK/NBK*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas $[(2dF/dT) vs T]$. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

El análisis de la expresión del gen *BIK/NBK* se realizó mediante el método Δ_{CT} y posteriormente se efectuó la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias en la expresión del gen *BIK/NBK* en sangre periférica de las 11 mujeres con y 6 sin cáncer de mama, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* entre ambos grupos de mujeres ($p=0.615$) (Figura 22).

Ranks				
	Cancer	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Dosalamenosdelta_BIK_	NO	6	8.17	49.00
HPRT_san	SI	11	9.45	104.00
	Total	17		

Test Statistics ^b	
	Dosalamenos delta_BIK_ HPRT_san
Mann-Whitney U	28.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.615
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.660 ^a

Figura 22. Prueba U de Mann-Whitney. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BIK/NBK* en las muestras provenientes de mujeres con y sin cáncer de mama ($p=0.615$).

Correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en tejido mamario neoplásico y sangre de mujeres con cáncer de mama.

Las 11 muestras de tejido mamario neoplásico mostraron amplificación del gen *HPRT1* (Figura 23) y del gen *BIK/NBK* (Figura 24).

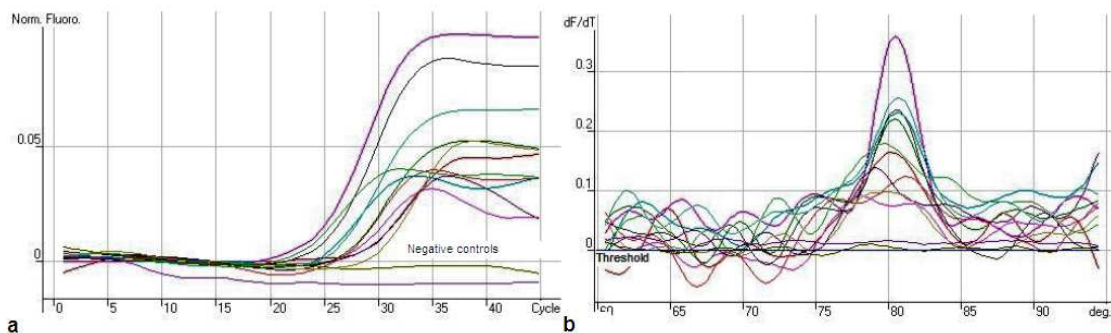


Figura 23. Expresión del gen *HPRT1* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 11 muestras de tejido mamario neoplásico. **a)** Curvas de amplificación del gen control *HPRT1*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen control *HPRT1*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas $[(2dF/dT) vs T]$. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

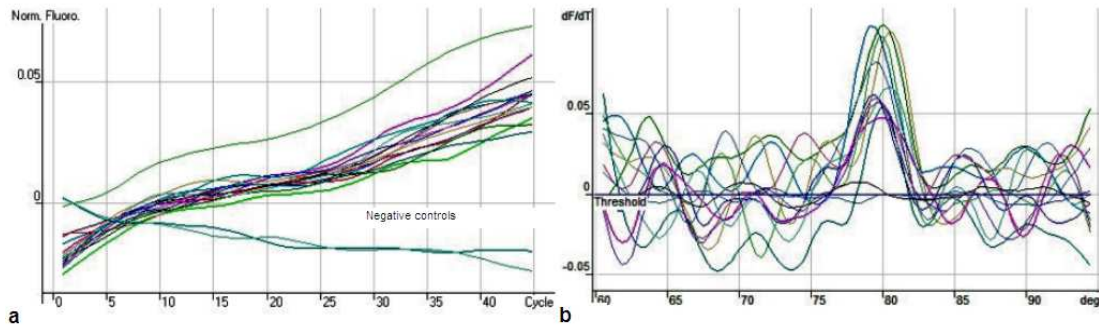


Figura 24. Expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 11 muestras de tejido mamario neoplásico. a) Curvas de amplificación del gen *BIK/NBK*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen *BIK/NBK*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas [(2dF/dT) vs T]. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

El análisis de la expresión del gen *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico de las 11 mujeres con cáncer de mama se realizó mediante el método Δ_{CT} y posteriormente se efectuó correlación de Spearman entre la expresión relativa de *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico y sangre periférica, sin embargo no se encontró significancia estadística ($p=0.405$) (Figura 25).

Correlations

		Dosalamenos delta_BIK_ HPRT_san	Dosalame nosdelta3
Spearman's rho	Dosalamenosdelta_BIK_ HPRT_san	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed)	1.000 -.253 .

Figura 25. Correlación de Spearman. No se encontró significancia estadística en la correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico y sangre periférica de 11 mujeres con cáncer de mama ($p=0.405$).

Validación de la expresión de los genes *CK-19* y *hMAM* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en tejido mamario neoplásico y en sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama.

9 de las 11 muestras de tejido mamario neoplásico de mujeres con cáncer de mama mostraron amplificación del gen *CK-19* (Figura 26) y todas las muestras de tejido mamario neoplásico de mujeres con cáncer de mama mostraron amplificación del gen *hMAM* (Figura 27), sin embargo ninguna de las 6 muestras de sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama mostró amplificación de estos genes (Figura 28).

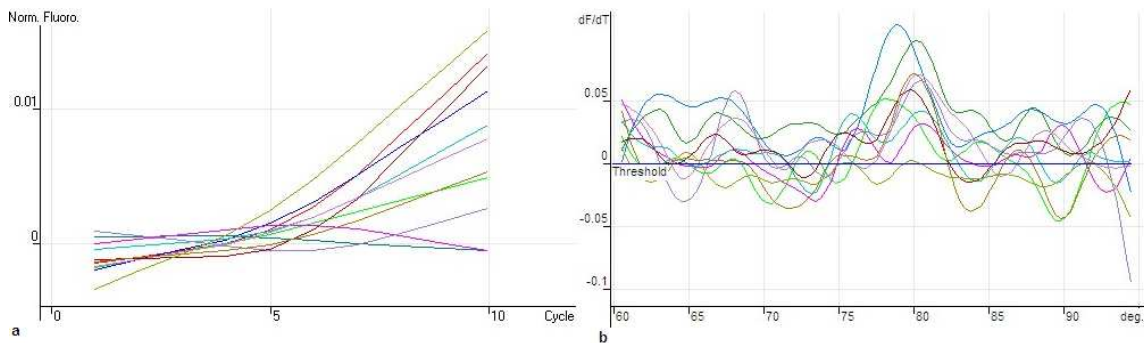


Figura 26. Expresión del gen *CK-19* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 11 muestras de tejido mamario neoplásico. a) Curvas de amplificación del gen *CK-19*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen *CK-19*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas $[(2dF/dT) vs T]$. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

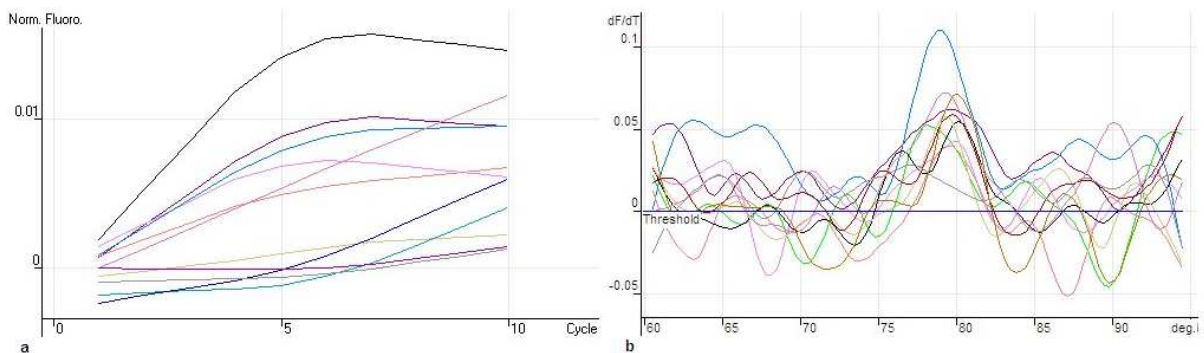


Figura 27. Expresión del gen *hMAM* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en 11 muestras de tejido mamario neoplásico. a) Curvas de amplificación del gen *hMAM*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. **b)** Análisis de curvas de disociación del gen *hMAM*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas $[(2dF/dT) vs T]$. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

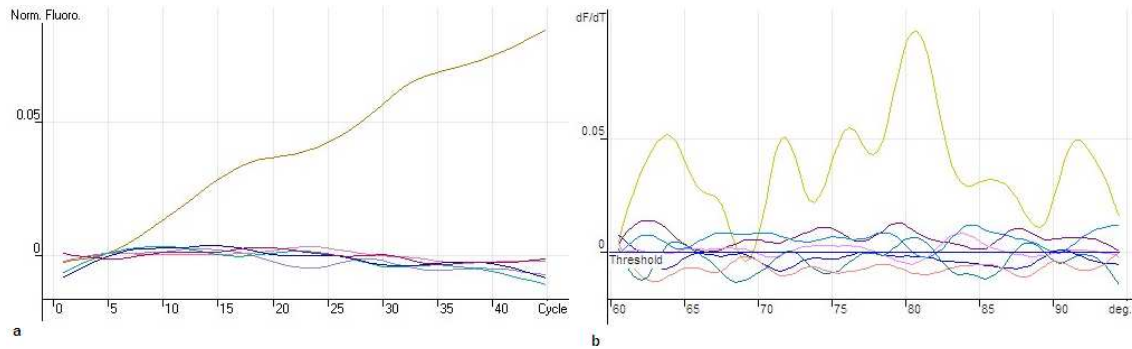


Figura 28. Expresión del gen *CK-19* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en muestras de sangre periférica de 6 mujeres sin cáncer de mama y una muestra de tejido mamario neoplásico como control positivo. a) Curvas de amplificación del gen *CK-19*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. b) Análisis de curvas de disociación del gen *CK-19*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas [(2dF/dT) vs T]. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

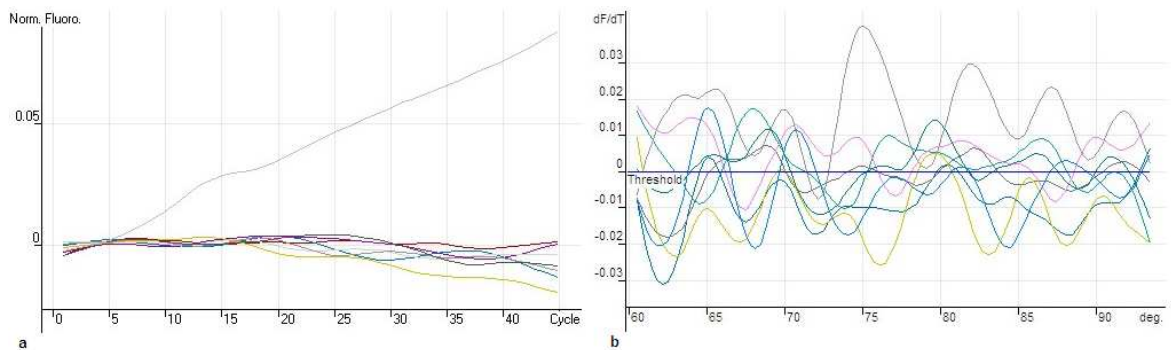


Figura 29. Expresión del gen *hMAM* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers en muestras de sangre periférica de 6 mujeres sin cáncer de mama y una muestra de tejido mamario neoplásico como control positivo. a) Curvas de amplificación del gen *hMAM*. La abscisa muestra las unidades de fluorescencia relativa y la ordinal el número de ciclos. b) Análisis de curvas de disociación del gen *hMAM*. La señal de fluorescencia (F) fue monitorizada continuamente durante la elevación de la temperatura y graficada contra la temperatura (T). Estas curvas fueron transformadas a curvas de disociación derivativas [(2dF/dT) vs T]. Gráfico generado por Rotor Gene 3000 real time PCR thermocycler (Corbett Research).

Determinación de la expresión de los receptores de estrógenos alfa y progesterona mediante inmunohistoquímica en tejido mamario neoplásico de 11 mujeres con cáncer de mama.

Independientemente y en forma cegada, se determinó la distribución y abundancia (en porcentaje) de los receptores de estrógeno alfa y progesterona sobre las laminillas obtenidas de las mismas muestras de tejido usadas para el diagnóstico histopatológico y ensayo de RT-qPCR. En la figura 30 (magnificación 400x) se ejemplifica la determinación de los ER α en una de las muestras de cáncer mamario. La presencia de ER α fue específica ya que cuando el anticuerpo primario fue obtenido, no se observó señal en el tejido neoplásico.

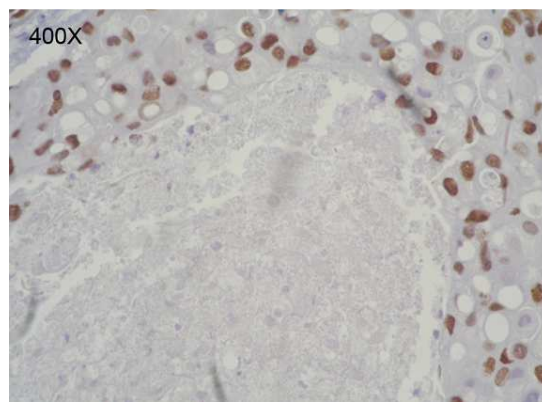


Figura 30. Distribución del receptor de estrógenos α en tejido mamario neoplásico. Anticuerpo-receptor de estrógeno α (anticuerpo policlonal) colocado con anticuerpo secundario-HRP y revelado con DAB. Se uso Hematoxilina como contra tinción.

5 muestras (45%) de tejido mamario neoplásico fueron negativas a receptores de estrógenos y 6 muestras (55%) fueron positivas (Figura 31).

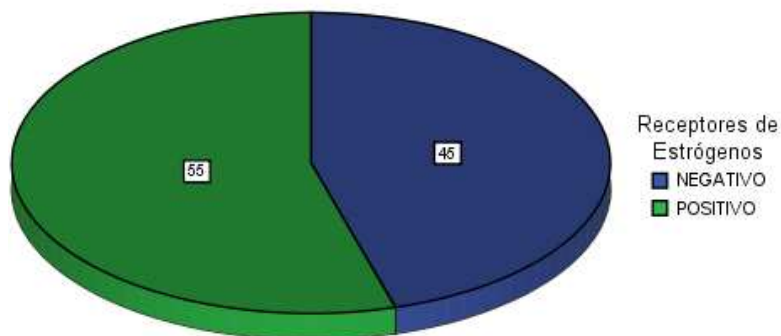


Figura 31. Receptores de estrógenos alfa. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estado de receptores de estrógenos alfa, en el tercer grupo de comparación

En la figura 32 (magnificación 400x) se ejemplifica la determinación de los receptores de progesterona en una de las muestras de cáncer mamario. La presencia de receptores de progesterona fue específica ya que cuando el anticuerpo primario fue obtenido, no se observó señal en el tejido neoplásico.

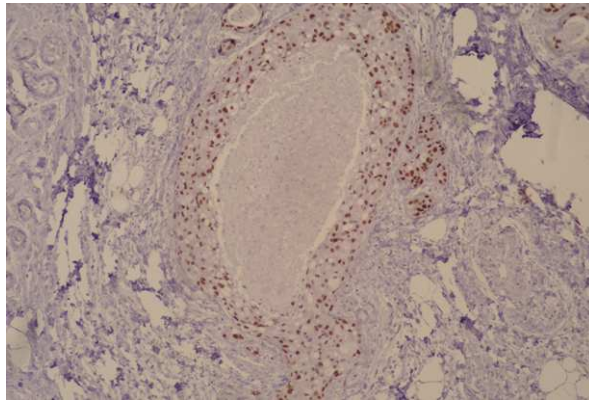


Figura 32. Distribución del receptor de progesterona en tejido mamario neoplásico. Anticuerpo-receptor de progesterona (anticuerpo policlonal) colocado con anticuerpo secundario-HRP y revelado con DAB. Se uso Hematoxilina como contra tinción.

6 muestras (45%) de tejido mamario neoplásico fueron negativas a receptores de progesterona y 5 muestras (55%) fueron positivas (Figura 33).

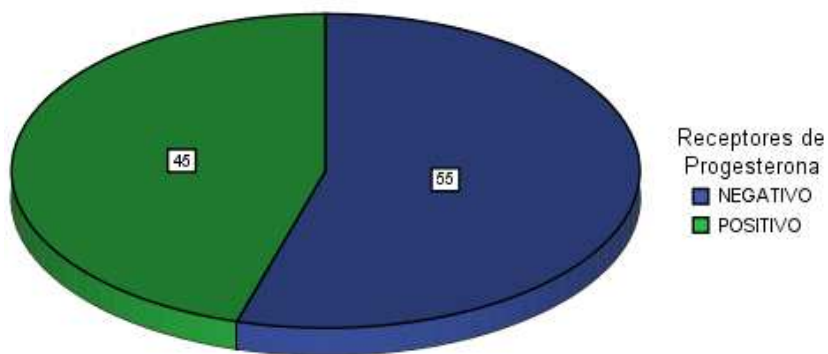


Figura 33. Receptores de progesterona. Porcentaje de mujeres con cáncer de mama de acuerdo al estado de receptores de progesterona, en el tercer grupo de comparación

Correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers con la expresión de receptores de estrógenos alfa en 11 muestras de tejido mamario neoplásico.

El análisis de la expresión del gen *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico de las 11 mujeres con cáncer de mama se realizó mediante el método Δ_{CT} (mostrado con anterioridad) y posteriormente se efectuó correlación de Spearman con el estado de receptores de estrógenos ($\rho = 0.751$ y $p = 0.004$) (Figura 34).

			Dosalame nosdelta2	Porcentaje de receptores de Estrógenos
Spearman's rho	Dosalamenosdelta2	Correlation Coefficient	1,000	,751**
		Sig. (1-tailed)	.	,004
		N	11	11
	Porcentaje de receptores de Estrógenos	Correlation Coefficient	,751**	1,000
		Sig. (1-tailed)	,004	.
		N	11	11

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

Figura 34. Correlación de Spearman. Se encontró correlación con significancia estadística entre la expresión del gen *BIK/NBK* y la expresión de receptores de estrógenos alfa en tejido mamario neoplásico ($p = 0.004$).

Correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR con LUX Fluorogenic Primers con la expresión de receptores de progesterona en 11 muestras de tejido mamario neoplásico.

El análisis de la expresión del gen *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico de las 11 mujeres con cáncer de mama se realizó mediante el método Δ_{CT} (mostrado con anterioridad) y posteriormente se efectuó correlación de Spearman con el estado de receptores de progesterona ($\rho = 0.808$ y $p = 0.003$) (Figura 35).

			Dosalame nosdelta2	Receptores de Progesterona
Spearman's rho	Dosalamenosdelta2	Correlation Coefficient	1,000	,808**
		Sig. (2-tailed)	.	,003
		N	11	11
	Receptores de Progesterona	Correlation Coefficient	,808**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,003	.
		N	11	11

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Figura 35. Correlación de Spearman. Se encontró correlación con significancia estadística entre la expresión del gen *BIK/NBK* y la expresión de receptores de progesterona en tejido mamario neoplásico ($p = 0.003$).

VI.DISCUSIÓN

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial (1). En México, esta neoplasia ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 40 años de edad (20). Uno de los factores que ha tenido considerable influencia en el pronóstico y la expectativa de vida de estas pacientes es el estadio clínico en el cuál se diagnóstica la enfermedad (86).

Recientemente se han efectuado diversos estudios para identificar nuevas técnicas moleculares y biomarcadores con potencial uso clínico para la detección de células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica en estadios tempranos de la enfermedad (87).

Se han observado considerables limitaciones con técnicas como inmunohistoquímica y citometría de flujo, se ha preferido el uso de técnicas moleculares con alta sensibilidad, tales como RT-qPCR, para la detección de biomarcadores específicos de células neoplásicas mamarias en sangre. Sin embargo, aunque la expresión de múltiples genes ha sido probada, solo algunos de ellos tales como citoqueratina 19, mamoglobina y maspina, han sido identificados con mayor sensibilidad y especificidad para la detección de células neoplásicas mamarias circulantes (46, 47, 88-91).

La necesidad de nuevos marcadores para mejorar la detección de células neoplásicas circulantes en sangre nos llevo a investigar un nuevo gen con potencial uso clínico. Se decidió determinar si la expresión del gen *BIK/NBK* (el cuál fue encontrado sobre-expresado a nivel mRNA y proteína en un estudio realizado en nuestra unidad de investigación) (49), podría constituir un biomarcador para la detección de células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica.

Inicialmente se determinó la expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-PCR en muestras de sangre de mujeres con y sin cáncer de mama. Todas las muestras expresaron el gen control *HPRT1*, demostrando una síntesis apropiada del cDNA y un funcionamiento adecuado del sistema de amplificación. Con respecto al gen *BIK/NBK*, se encontró su expresión en una sola muestra de sangre proveniente de una mujer con cáncer de mama. Debido a que ninguna de las muestras de sangre

provenientes de mujeres sin cáncer mama mostró expresión del gen *BIK/NBK* y la prueba estadística no mostró diferencias significativas entre los dos grupos comparados, este resultado llevo a pensar que el sistema de detección usado no había sido lo suficientemente sensible o que las pacientes podrían encontrarse en un estadio clínico muy temprano o incipiente. Por esta razón se determinó la expresión del gen *BIK/NBK* con una técnica molecular más sensible, en muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama esporádico, tomando en consideración el estadio clínico de cada una de ellas (88).

Se realizó la cuantificación relativa de la expresión del gen *BIK/NBK* mediante RT-qPCR en muestras de sangre de mujeres con cáncer de mama clasificadas por estadios clínicos, usando como gen control al gen *HPRT1*. Sorprendentemente, todas las muestras amplificaron ambos genes y cuando se determinaron las diferencias en la expresión génica entre mujeres con cáncer de mama en diferentes estadios, no se encontraron diferencias significativas. Se pensó que una de las posibles razones por las que no se habían encontrado diferencias, era que no todas las muestras de sangre sobre-expresaban el gen *BIK/NBK* debido a que no todos los tumores sobre-expresaban dicho gen. Este resultado llevo a utilizar el sistema LUX Fluorogenic Primers (una metodología molecular que ha sido reportada como con alta especificidad en la detección de productos de amplificación) (92), en otro grupo de pacientes con cáncer de mama, para determinar la correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* entre tejido neoplásico mamario y sangre periférica. Se esperaba que las mujeres con sobre-expresión del gen *BIK/NBK* en tejido mamario neoplásico también tuvieran sobre-expresión en sangre, sin embargo, no se encontró correlación estadísticamente significativa en la expresión de dicho gen en los dos tejidos analizados, lo cual indicó que la expresión de este gen en sangre es aparentemente independiente de la expresión encontrada en tejido mamario neoplásico.

Para confirmar la posible función de la expresión del gen *BIK/NBK* como biomarcador de células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica, mediante una técnica de alta sensibilidad y un sistema de alta especificidad, se comparó su expresión en 11 muestras de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama con 6 muestras de sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama.

Inesperadamente los resultados fueron contrarios a lo que ha sido reportado (67) y a lo previamente se observó mediante RT-PCR. Se encontró que todas las muestras de sangre periférica de mujeres con y sin cáncer de mama expresaban tanto el gen control *HPRT1* como el gen *BIK/NBK*. La prueba estadística no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, lo cual indicó que el gen *BIK/NBK* tiene un nivel basal de expresión en células de sangre periférica.

Adicionalmente y para validar que los resultados de expresión del gen *BIK/NBK* provenían de células epiteliales mamarias, se determinó la expresión de los genes *CK-19* y *hMAM*, encontrando ambos genes expresados en la mayoría de las muestras de tejido mamario neoplásico y en ninguna de las muestras de sangre periférica de mujeres sin cáncer de mama.

En lo que respecta a la función de *BIK/NBK* como biomarcador de células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica, no se encontraron diferencias significativas en su expresión entre los diversos grupos de individuos y aunque pudiera encontrarse mayor significancia estadística con un gran número de muestras, la necesidad de marcadores de alta sensibilidad y especificidad demanda diferencias significativas aun en un pequeño número de pacientes.

Sin embargo se considero necesario continuar el estudio de este gen y su papel en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, su valor pronóstico y su potencial uso como blanco terapéutico.

Aunque diversos reportes han sugerido que *BIK/NBK* puede funcionar como gen pro-apoptótico tumor supresor en tejidos específicos (53, 56, 67, 93-95), también se ha reportado la correlación de la sobre-expresión de este gen con mal pronóstico en cáncer pulmonar de células no pequeñas (96). La sobre-expresión de otro miembro de la familia BH3, *BNIP3*, también ha sido reportada como asociado a mal pronóstico en cáncer de mama (97) y en cáncer pulmonar de células no pequeñas (98). Esto puede sugerir que existe un fenómeno adaptativo de las células tumorales a pesar de la sobre-expresión de genes pro-apoptóticos, con la subsecuente progresión hacia una conducta tumoral agresiva (99).

Además, diversos estudios han evaluado la regulación de apoptosis por estrógenos en células de cáncer de mama, demostrando la importancia de la vía mitocondrial o vía intrínseca, la cual involucra a la familia de proteínas BCL-2 y dentro de estas al gen *BIK/NBK*, en la apoptosis de células de cáncer de mama regulada por estrógenos (74).

Los estrógenos juegan un papel esencial en las señales de proliferación celular mediadas por receptores de estrógenos, los cuales funcionan como transductores de señales y factores de transcripción para regular la expresión de genes blanco (100).

Los receptores de estrógenos pertenecen a la familia de receptores esteroideos de factores de transcripción, y han sido identificados dos subtipos ER α (receptores de estrógenos alfa) y ER β (receptores de estrógenos beta) (101). Estos receptores de estrógenos generalmente pueden formar homo o heterodímeros antes de unirse al DNA. La regulación transcripcional de genes blanco en respuesta a E2 (17 β -estradiol) es mediada por dos mecanismos importantes. En uno, el complejo E2-ER se une directamente a secuencias de DNA genómico llamados ERE (elementos de respuesta a estrógenos), este complejo interactúa con proteínas reguladoras, promoviendo el remodelamiento de la cromatina y atrayendo a la maquinaria de la transcripción con la consiguiente iniciación de la transcripción (102).

Adicionalmente el estradiol tiene efectos no genómicos iniciados en la membrana, los cuáles ocurren minutos después de la administración de estradiol y son independientes de la transcripción mediada por receptores de estrógenos. (103).

En este trabajo, además encontramos correlación de la expresión del gen *BIK/NBK* con la expresión de receptores de estrógenos alfa y progesterona en tejido mamario neoplásico, demostrando que la asociación previamente reportada en cultivos de células MCF-7/BUS (68), también está presente en muestras de tejido neoplásico mamario directamente obtenidas de pacientes con cáncer de mama. Sin embargo en este estudio se observó mayor expresión del gen *BIK/NBK* a nivel mRNA en el caso de la muestras estrógeno receptor positivas y menor expresión del gen *BIK/NBK* en muestras estrógeno receptor negativas, indicando que la expresión de este gen

podría estar implicada en el pronóstico y en la respuesta terapéutica de las pacientes.

Además encontramos que la correlación es mayor entre la expresión del gen *BIK/NBK* y la expresión de los receptores de progesterona, aún cuando estos últimos están íntimamente relacionados con los receptores de estrógenos, sería conveniente estudiar más a fondo este hallazgo.

VII. CONCLUSIONES

La expresión del gen *BIK/NBK* no es un biomarcador estadísticamente significativo en la detección de células neoplásicas mamarias circulantes en sangre periférica, sin embargo existe una correlación significativa entre la expresión de receptores de estrógeno y progesterona que hace necesario continuar el estudio de este gen y evaluar su papel en el desarrollo y progresión de cáncer de mama, así como su valor pronóstico y de blanco terapéutico en el manejo de los pacientes con cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Breast Cancer Home Page.
<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
Consulta: 28 mayo 2010.
2. Flores-Luna L, Salazar-Martínez E, Duarte-Torres RM, Torres-Mejía G, Alonso-Ruíz P, Lazcano-Ponce E. Prognostic factors related to breast cancer survival. *Salud Publica Mex* 2008;50:119-125.
3. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;347:1713-1727.
4. Vogelstein B. Breast Cancer. Mc Graw Hill 1998. Chapter 30: 537-550.
5. Wiseman BS, Werb Z. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science* 2002;296:1046-1049.
6. Broët P, de la Rocheforrière A, Scholl SM, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC, Pouillart P, Asselain B. Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 1995;13:1578-1583.
7. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Eng J Med* 2001;344:276-285.
8. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H, Sauter G. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539.
9. JAMA patient page: Breast cancer. *JAMA* 1999;281:772.
10. Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1126.
11. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-323.

12. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 2000;283:485-491.
13. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of Cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:331-341.
14. Berry DA, Parmigiani G, Sanchez J, Schildkraut J, Winer E. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *J Nat Can Inst* 1997;226:227-238.
15. Welch P, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Nature Reviews* 2001;10:705-713.
16. Folias A, Matkovic M, Bruun D, Reid S, Hejna J, Grompe M, D'Andrea A, Moses R. BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Human Molecular Genetics* 2002;11:2591-2597.
17. Witt E, Ashworth A. D-Day for BRCA2. *Science* 2002;297:534.
18. Bièche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:227-251.
19. Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D. Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* 1998;19:181-186.
20. INEGI. Estadísticas vitales, 2007. Bases de datos.
www.ceprec.org/CancerMx2010.pdf
Consulta: 28 mayo 2010.
21. CONAPO. Proyecciones de la población de México, 2005-2050.
www.conapo.gob.mx/00cifras/proy/Proy05-50.pdf
Consulta: 28 mayo 2010.
22. Humphrey LL, Helfand M, Chan BK, Woolf SH. Breast cancer screening: a summary of the evidence for de U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002;137:347-360.
23. Nyström L, Andersson I, Bjurstam N, Frisell J, Nordenskjöld B, Rutqvist LE. Long term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomized trials. *Lancet* 2002;359:909-919.
24. Smith RA, Cokkinides V, von Eschenbach AC, Levin B, Cohen C, Runowicz CD, Sener S, Saslow D, Eyre HJ; American Cancer Society. American cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2002;52:8-22.

25. Olson O, Gotzche PC. Cochrane review on screening for breast cancer with mammography. *Lancet* 2001;358:1340-1342.
26. A Brem RF, Behrndt VS, Sanow L, Gatewood OM. Atypical ductal hyperplasia: histologic underestimation of carcinoma in tissue harvested from impalpable breast lesions using 11 gauge stereotactically guided directional vacuum-assisted biopsy. *AJR AM J Roetgenol* 1999;172:1405-1407.
27. Baker JA, Soo MS. Breast US: assessment of technical quality and image interpretation. *Radiology* 2002;223:229-238.
28. Olson JA Jr, Morris EA, Van Zee KJ, Linehan DC, Borgen PI. Magnetic resonance imaging facilitates breast conservation for occult breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7:411-415.
29. van der Hoeven JJ, Hoekstra OS, Comans EF, Pijpers R, Boom RP, van Geldere D, Meijer S, Lammertsma AA, Teule GJ. Determinants of diagnostic performance of (F-18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography for axillary staging in breast cancer. *Ann Surg* 2002;236:619-624.
30. Shen KW, Wu J, Lu JS, Han QX, Shen ZZ, Nguyen M, Shao ZM, Barsky SH. Fiberoptic ductoscopy for patients with nipple discharge. *Cancer* 2000;89:1512-1519.
31. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies: to excise or not to excise? *Am J Surg Pathol* 2002;26:1095-1110.
32. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:3628-3636.
33. Fisher ER, Dignam J, Tan-Chiu E, Costantino J, Fisher B, Paik S, Wolmark N. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eight year update of protocol B-17: Intraductal carcinoma. *Cancer* 1999;86:429-438.
34. Lawrence M. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. USA. Lange 2004. pp. 680-681.
35. Carmeci C, deConinck EC, Lawton T, Bloch DA, Weigel RJ. Analysis of estrogen receptor messenger RNA in breast carcinomas from archival specimens is predictive of tumor biology. *Am J Pathol* 1997;150:1563-1570.

36. Raabe NK, Hagen S, Haug E, Fossaa SD. Hormone receptor measurements and survival in 1335 consecutive patients with primary invasive breast carcinoma. *Int J Oncol* 1998;12:1091-1096.
37. Leary A, Dowsett M. Combination therapy with aromatase inhibitors: the next era of breast cancer treatment? *Br J Cancer* 2006;95:661-666.
38. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 2010;6:195-197.
39. Shamliyan T, Wang SY, Virnig BA, Tuttle TM, Kane RL. Association between patient and tumor characteristics with clinical outcomes in women with ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2010:121-129.
40. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. HER-2/Neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 2000;5:199-207.
41. Abrams JS. Adjuvant therapy for breast cancer- results from the USA Consensus Conference. *Breast Cancer* 2001;8:298-304.
42. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233-1241.
43. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-3827.
44. Ludwig J, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:845-856.
45. Rouzier R, Extra JM, Klijanienko J, Falcou MC, Asselain B, Vincent-Salomon A, Vielh P, Boustyn E. Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes. *J Clin Oncol* 2002;20:1304-1310.
46. Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W, Narod S, McCready DR, Seth A, Marks A. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the

- blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60:143-151.
47. Stathopoulou A, Mavroudis D, Perraki M, Apostolaki S, Vlachonikolis I, Lianidou E, Georgoulas V. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers. *Anticancer Res* 2003; 23:1883-1890.
48. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2013-2019.
49. García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R, Arenas D. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples de mexican females. *BMC Cancer* 2005;5:93.
50. Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Custeau D, Chittenden T, Chinnadurai G, Gourdeau H. The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther* 2001;2:95-102.
51. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ. Bik a novel death inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 1995;11:1921-1928.
52. Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk/Bik. *Oncogene* 2005;24:7369-7380.
53. Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD, Sikic BI. High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res* 2005;65:4088-4096.
54. Bandres E, Catalan V, Sola I, Honorato B, Cubedo E, Cordeu L, Andion E, Escalada A, Zarate R, Salgado E, Zabalegui N, García F, Garcia-Foncillas J. Dysregulation of apoptosis is a major mechanism in the lymph node involvement in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2004;12:287-292.
55. Pompeia C, Hodge DR, Plass C, Wu YZ, Marquez VE, Kelley JA, Farrar WL. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2004;64: 3465-3673.

56. Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 38:91-96.
57. Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 280:23829-23836.
58. Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Stärck L, Radetzki S, Dörken B, Schulze-Osthoff K, Daniel PT. Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* 2003;22:3580-3590.
59. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 2005;24:1546-1556.
60. Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther* 2005;4:443-449.
61. Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ, Fang B. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 2005;24:4993-4999.
62. Zhu H, Guo W, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Dong F, Fang B. Proteasome Inhibitors-Mediated TRAIL Resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biol Ther* 2005;4:781-786.
63. Zou Y, Peng H, Zhou B, Wen Y, Wang SC, Tsai EM, Hung MC. Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene Bik. *Cancer Res* 2002;62:8-12.
64. Li Z, Ding Q, Li Y, Miller SA, Abbruzzese JL, Hung MC. Suppression of pancreatic tumor progression by systemic delivery of a pancreatic-cancer-specific promoter driven Bik mutant. *Cancer Lett* 2006;236:58-63.
65. Coultas L, Bouillet P, Stanley EG, Brodnicki TC, Adams JM, Strasser A. Proapoptotic BH3-Only Bcl-2 Family Member Bik/Bik/Nbk Is Expressed in Hemopoietic and Endothelial Cells but Is Redundant for Their Programmed Death. *Mol Cell Biol* 2004;24:1570-1581.
66. Verma S, Budarf ML, Emanuel BS, Chinnadurai G. Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: Chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences. *Gene* 2000;254:157-162.

67. Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R. Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1999;94:1100-1107.
68. Hur J, Chesnes J, Coser KR, Lee RS, Geck P, Isselbacher KJ, Shioda T. The Bik BH3-only protein is induced in estrogen-starved and antiestrogen-exposed breast cancer cells and provokes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2351-2356.
69. Wiseman BS, Werb Z. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science* 2002;296:1046-1049.
70. Medina D: Mammary developmental fate and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:483-495.
71. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003;63:8037-8050.
72. Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SRD, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE, Dowsett M. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997;72:608-613.
73. Kandouz M, Lombet A, Perrot J-Y, Jacob D, Carvajal S, Kazem A, Rostene W, Therwath A, Gompel A. Proapoptotic effects of antiestrogens, progestins and androgen in breast cancer cells. *J Steroid Biochem* 1990;35:535-541.
74. Wang TTY, Phang JM. Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1995;55:2487-2489.
75. Leung LK, Do L, Wang TT. Regulation of death promoter Bak expression by cell density and 17 beta-estradiol in MCF-7 cells. *Cancer Lett* 1998;124:47-52.
76. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322.
77. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998;17:3207-3213.
78. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med* 2003;228:995-1003.
79. Burow ME, Weldon CB, Tang Y, McLachlan JA, Beckman BS. Oestrogen-mediated suppression of tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis in MCF-

- 7 cells: subversion of Bcl-2 by anti-oestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:409-418.
80. Pratt MAC, Bishop TE, White D, Yasvinski G, Ménard M, Niu MY, Clarke R. Estrogen withdrawal-induced NF- κ B activity and Bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence. *Mol Cell Biol* 2003;23:6887-6900.
81. Zhang G-J, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X_L, without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 1999;5:2971-2977.
82. Kandouz M, Siromachkova M, Jacob D, Chretien-Marquet B, Therwath A, Gompel A. Antagonism between estradiol and progestin on BCL-2 expression in breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1996;68:120-125.
83. Teixeira C, Reed JC, Pratt MAC. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3902-3907.
84. Pertegas Díaz S. Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. *Cad Aten Primaria*; 2002;9:209-211.
85. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* 2008;3:1101-1107.
86. Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2010: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2010;60:99-119.
87. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Path* 2004;57:903-911.
88. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* 2007;8:234-251.
89. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, Stathopoulos EN, Chlouverakis G, Lianidou E, Kakolyris S, Georgoulis V, Mavroudis D. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2177-2184.

90. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, Kontopodis E, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 2009;101:589-597.
91. Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, Gillanders WE, Hoda R, Schutte del H, Callahan K, Mitas M, Cole DJ. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study. *BMC Cancer* 2008;8:55.
92. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e37.
93. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B, Daniel PT. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* 2006;13:619-627.
94. Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999;117:831-837.
95. Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, Squire JA, Kamel-Reid S. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene* 2002;19:6480-6487.
96. Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R, You M. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2006;3:e467.
97. Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C, Harris AL. Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J Pathol* 2003;201:573-580.
98. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sowter HM, Sivridis E, Gibson S, Gatter KC, Harris AL. BNIP3 expression is linked with hypoxiaregulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5566-5571.

99. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 2008;27:S20-S29.
100. Abba MC, Hu Y, Sun H, Drake JA, Gaddis S, Baggerly K, Sahin A, Aldaz CM. Gene expression signature of estrogen receptor α status in breast cancer. *BMC Genomics* 2005;6:37.
101. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.
102. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2905-2919.
103. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. *J Biol Chem* 2002;277:50768-50775.



ANEXO 1.
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

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

1. Información sobre el estudio.

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

Por este conducto se le solicita su consentimiento informado para realizar la búsqueda de expresión de cinco genes denominados *BIK/NBK*, *CK-19*, *hMAM* y *HPRT1* en muestras de tejido tumoral mamario y sangre periférica que permitirá conocer si el gen *BIK/NBK* puede funcionar como marcador de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en diferentes etapas de su enfermedad.

2. Procedimiento.

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

a. Riesgos:

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

b. Beneficios.

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

3. Confidencialidad.

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

4. Participación / suspensión.

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

5. Consentimiento.

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

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

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

Nombre: _____ Afiliación _____

Edad: _____ Lugar de nacimiento: _____

Abuelos
mexicanos: _____

Estadio clínico según clasificación TNM: _____

Expresión del gen BIK en tejido fresco de biopsia de tejido tumoral mamario: _____

Expresión del gen BIK en células circulantes en sangre periférica: _____

Expresión del gen hMAM en tejido fresco de biopsia de tejido tumoral mamario: _____

Expresión del gen hMAM en células circulantes en sangre periférica: _____

Expresión del gen CK-19 en tejido fresco de biopsia de tejido tumoral mamario: _____

Expresión del gen CK-19 en células circulantes en sangre periférica: _____

Expresión del gen *HPRT1* en tejido fresco de biopsia de tejido tumoral mamario: _____

Expresión del gen *HPRT1* en células circulantes en sangre periférica: _____

Fecha: _____

ANEXO 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

EXTRACCIÓN Y COLECCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA.

1. A través de punción en vena periférica obtener 6 mL de sangre.
2. Colocar inmediatamente en tubos BD Vacutainer™ K₃ EDTA de 10 mL.
3. Homogenizar la sangre con el EDTA.
4. Mantener en hielo hasta el momento de efectuar el aislamiento del RNA total, mismo que se realiza en menos de una hora después de la extracción de sangre.

EXTRACCION DE RNA TOTAL DE SANGRE PERIFÉRICA.

1. Colocar 3 mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences®) en tubo de ensayo de cristal de 13 x 100 mm nuevo.
2. Agregar 2 mL de sangre periférica en la parte superior del Ficoll-Paque, evitando que se mezclen. (Paso 1 y 2 se realiza por duplicado).
3. Centrifugar por 25 minutos a 1500 rpm (Centrífuga clínica Solbat®, modelo J-12).
4. Con pipeta Pasteur recolectar las células de la interfase blanca y colocarlas en tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm (Centrífuga Eppendorf®, modelo 54150).
6. Retirar el sobrenadante.
7. De acuerdo al manual del paquete comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®) para aislamiento de RNA total, agregar 350µL de amortiguador RLT previamente preparado con β-Mercaptoetanol (β-ME) a una dilución de 10 µL β-ME por 1 mL de amortiguador RLT.
8. Agitar con vortex por 3- 4 minutos (Vortex-Genie®, modelo K-550-G).
9. Agregar un volumen de 350 µL de etanol al 70% y homogenizar.
10. Transferir el contenido del tubo (700µL) a la columna RNeasy mini.
11. Centrifugar 15 segundos a 12,000 rpm y quitar el líquido del tubo de recolección transparente.
12. Adicionar un volumen de 700 µL de RW1 a la columna y centrifugar 15 segundos a 12,000 rpm.
13. Desechar el tubo de colección con el líquido recolectado.

14. Colocar la columna en otro tubo de colecta de 2 mL nuevo y agregar 500 μ L de RPE a la columna.
15. Centrifugar 15 segundos a 12,000 rpm.
16. Desechar el líquido.
17. Agregar nuevamente 500 μ L de RPE a la columna y centrifugar dos minutos a 12,000 rpm.
18. Desechar el tubo de colección y colocar la columna en un tubo nuevo y centrifugar un minuto a 12,000 rpm para eliminar residuos de RPE.
19. Transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y agregar 30 μ L de agua libre de RNasa en la membrana blanca y cerrar el tubo. Centrifugar un minuto a 12,000 rpm.
20. Almacenar a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

COLECCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL MAMARIO FRESCO.

1. Colocar muestra de tejido fresco en criotubo.
2. Transportar en contenedor de nitrógeno líquido.
3. Almacenar a -70°C o bien procesar inmediatamente

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO TUMORAL MAMARIO FRESCO POR EL MÉTODO DE TRIZOL

1. Pulverizar tejido en nitrógeno líquido con mortero y pistilo previamente esterilizado y sin RNA asas.
2. Homogeneizar el tejido con Trizol, la cantidad a utilizar dependerá del número de células. Agregar 1 mL de Trizol para 3×10^7 células.
3. Colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 40 μ L de cloroformo y agitar fuertemente durante 15 segundos
6. Centrifugar a 13 000 rpm durante 15 segundos a 4°C .
7. Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo (ahí esta el RNA)
8. Precipitar el RNA agregando isopropanol helado vol/vol.
9. Incubar por 10 minutos a 4°C y decantar sobrenadante.
10. Lavar la pastilla con etanol al 75% en agua tratada DEPC.
11. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

12. Centrifugar a 7500 rpm 10 minutos a 4°C y decantar sobrenadante.
13. Secar la pastilla a temperatura ambiente.
14. Resuspender el RNA en 30-50 µL de agua tratada DEPC.
15. Almacenar a -70°C.

ELABORACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA CONFIRMAR INTEGRIDAD DE RNA TOTAL.

1. Lavar cámara de electroforesis con NaOH 10N por una hora y enjuagar con agua destilada antes de su uso.
2. Colocar 50 mL de TBE 1X y 1 g de agarosa grado molecular en vaso de precipitado.
3. Fundir la agarosa a aproximadamente 50°C.
4. Agregar 3µL de bromuro de etidio (concentración 1µg/mL) y homogenizar.
5. Colocar en la cámara de electroforesis, dejar polimerizar.
6. Agregar amortiguador TBE 1X hasta que se cubran ligeramente los pozos.
7. Cargar 2 µL de muestra mezclada con 1 µL de azul de bromofenilo (6X).
8. Separar los ácidos nucleicos mediante 70 Volts durante 120 minutos.
9. Visualizar el gel a través de transiluminador de luz ultravioleta (Mighty bright, Hoefer Scientific InsTM).

CUANTIFICACION DE RNA CON ESPECTROFOTOMETRO.

Una alícuota de RNA total (2µL) se mezcla con 98 µL de agua y se coloca en una celdilla para análisis en espectrofotómetro a 260nm y 280 nm (Ultrospect 2000, Pharmacia Biotech®), asumiendo que una densidad óptica equivale a 40µg/mL.

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Secuencia del gen *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase)

Se diseñó un par de oligonucleótidos, con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Ryslik) y se sintetizaron por Invitrogen™ life technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gen Bank, NCBI con el número NM 000194 y con una Tm de 58 °C para cada uno.

```
ORIGIN
  1 tcttgctgcg cctcgcctc ctctctgct ccgccaccgg cttcctcctc ctgagcagtc
 61 agcccgcgcg cgggcggct cggttatggc gaccgcgagc cctggcgctg tgattagtga
121 tgatgaacca ggttatgacc ttgatttatt ttgcatacct aatcattatg ctgaggattt
181 ggaaaggggtg tttattcctc atggactAAT TATGGACAGG ACTGAACGTC ttgctcgaga
241 tgtgatgaag gagatgggag gccatcacat tgtagccctc tgtgtgctca aggggggcta
301 taaattcttt gctgacctgc tggattacat caaagcactg aatagaaata gtgatagatc
361 cattcctatg actgtagatt ttatcagact gaagagctat tgtaatgacc agtcaacagg
421 ggacataaaa gtaattggtg gagatgatct ctcaacttta actggaaga atgtcttgat
481 tgtggaagat ataattgaca ctggcaaac aatgcagact ttgctttcct tggtcaggca
541 gtataatcca aagatggtca aggtcgcaag CTTGCTGGTG AAAAGGACCC CACGaagtgt
601 tggatataag ccagactttg ttggatttga aattccagac aagtttgttg taggatatgc
661 ccttgactat aatgaatact tcagggattt gaatcatggt tgtgtcatta gtgaaactgg
721 aaaagcaaaa tacaagcct aagatgagag ttcaagttga gtttggaac atctggagtc
781 ctattgacat cgccagtaaa attatcaatg ttctagttct gtggccatct gcttagtaga
841 gctttttgca tgtatcttct aagaatttta tctgtttgt actttagaaa tgtcagttgc
901 tgcattccta aactgtttat ttgcactatg agcctataga ctatcagttc cctttggcg
961 gattgttgtt taacttgtaa atgaaaaaat tctcttaaac cacagcacta ttgagtga
1021 cattgaactc atatctgtaa gaaataaaga gaagatata tagtttttta attggtattt
1081 taatttttat atatgcagga aagaatagaa gtgattgaat attgttaatt ataccaccgt
1141 gtgttagaaa agtaagaagc agtcaatttt cacatcaaag acagcatcta agaagttttg
1201 ttctgtcctg gaattatttt agtagtgttt cagtaatggt gactgtattt tccaacttgt
1261 tcaaattatt accagtgaat ctttgtcagc agttcccttt taaatgcaaa tcaataaatt
1321 cccaaaaatt t
```

En letras negras y mayúsculas se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento de 387 pb.

Secuencia del gen BIK.

Se diseñaron un par de oligonucleótidos, con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysclik) y se sintetizaron por Invitrogen™ life technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gen Bank, NCBI con el número U34584 y con una Tm de 55 °C para cada uno.

```
ORIGIN
  1 cagcatcgcc gccgccagag gagaaatgtc tgaagtaaga cccctctcca GAGACATCTT
 61 GATGGAGACC ctctgtatg agcagctcct ggaacccccg accatggagg ttcttggcat
121 gactgactct gaagaggacc tggaccctat ggaggacttc gattctttgg aatgcatgga
181 gggcagtgac gcattggccc tgcggctggc ctgcatcggg gacgagatgg acgtgagcct
241 cagggccccg cgcttggccc agctctccga ggtggccatg cacagcctgg gtctggcttt
301 catctacgac cagactgagg ACATCAGGGA TGTTCTTAGA agtttcatgg acggtttcac
361 cacacttaag gagaacataa tgaggttctg gagatccccg aaccccgggt cctgggtgtc
421 ctgccaacag gtgctgctgg cgctgctgct gctgctggcg ctgctgctgc cgctgctcag
481 cgggggcctg cacctgctgc tcaagtgagc ccccggcggc tcaggcgtgg ctggccccac
541 ccccatgacc actgccctga ggtggcggcc tgctgctggt atctttttaa ctgttttctc
601 atgatgcctt ttatattaac cccgtgatag tgctggaaca ctgctgaggt tttatactca
661 ggttttttgt ttttttttta ttccagtttt cgttttttct aaaagatgaa ttctatggc
721 tctgcaattg tcaccgggta actgtggcct gtgccagga agagccattc actcctgccc
781 ctgcccacac ggcaggtagc agggggagtg ctggtcacac ccctgtgtga tatgtgatgc
841 cctcggcaaa gaatctactg gaatagattc cgaggagcag gagtgtctca taaaatgttg
901 gtttccagca aaaaaaaaaa aaa
```

En letras negras y mayúsculas se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento de 290 pb (“Forward” 5’ GAGACATCTTGATGGAGACC 3’ y “Reverse” 5’ ACATCAGGGA TGTTCTTAGA 3’).

Secuencia del gen MAMOGLOBINA (hMAM).

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysclik) y se sintetizaron por Invitrogen™ life technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gen Bank, NCBI con el número NM 002411.

```
ORIGIN
1  gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc
61  atgaagttgc tgatggctct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct
121 ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact
181 gaatacaaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg ccactacaaa tgccatagat
241 gaattgaagg aatgttttct taaccaaacy gatgaaactc tgagcaatgt tgagggtgtt
301 atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gatttatttt aactttctgc aagacctttg
361 gctcacagaa ctgcagggtg tggtgagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt
421 ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg
481 tttattttaa taaattgatg gca
```

Secuencia del gen CITOKERATINA 19

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysclik) y se sintetizaron por Invitrogen™ life technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gen Bank, NCBI con el número NM002276.

```
1 agatatccgc ccctgacacc attcctccct tccccctcc accggccgcg ggcataaaag
61 ggcgccaggtg agggcctcgc cgctcctccc gcgaatcgca gcttctgaga ccagggttgc
121 tccgtccgtg ctccgcctcg ccatgacttc ctacagctat cgccagtcgt cggccacgtc
181 gtccttcgga ggcctgggcg gcggctccgt gcgttttggg ccgggggtcg cctttcgcgc
241 gccagcatt cacgggggct ccggcggccg cggcgtatcc gtgtcctccg cccgctttgt
301 gtcctcgccc tcctcggggg cctacggcgg cggctacggc ggcgtcctga ccgctccga
361 cgggctgctg gcgggcaacg agaagctaac catgcagaac ctcaacgacc gcctggcctc
421 ctacctggac aagggtgcgc ccctggaggc ggccaacggc gagctagagg tgaagatccg
481 cgactggtag cagaagcagg ggctggggc ctcccgcgac tacagccact actacacgac
541 catccaggac ctgcgggaca agattcttgg tgccaccatt gagaactcca ggattgtcct
601 gcagatcgac aatgcccgtc tggctgcaga tgacttccga accaagtttg agacggaaca
661 ggctctgcgc atgagcgtgg aggccgacat caacggcctg cgcaggggtc tggatgagct
721 gaccctggcc aggaccgacc tggagatgca gatcgaaggc ctgaaggaag agctggccta
781 cctgaagaag aaccatgagg aggaaatcag tacgctgagg ggccaagtgg gaggccaggt
841 cagtgtggag gtggattccg ctccgggcac cgatctcgcc aagatcctga gtgacatgcg
901 aagccaatat gaggtcatgg ccgagcagaa ccggaaggat gctgaagcct ggttcaccag
961 ccggactgaa gaattgaacc gggaggctcg tggccacacg gagcagctcc agatgagcag
1021 gtccgaggtt actgacctgc ggcgaccct tcaggggtctt gagattgagc tgcagtcaca
1081 gctgagcatg aaagctgcct tggaaagacac actggcagaa acggaggcgc gctttggagc
1141 ccagctggcg catatccagg cgctgatcag cggtattgaa gccagctgg gcgatgtgcg
1201 agctgatagt gagcggcaga atcaggagta ccagcggctc atggacatca agtcgaggct
1261 ggagcaggag attgccacct accgcagcct gctcgaggga caggaagatc actacaacaa
1321 tttgtctgcc tccaaggtcc tctgaggcag caggctctgg ggcttctgct gtcctttgga
1381 ggggtgtctt tgggtagagg gatgggaagg aaggaccct taccctcggc tcttctcctg
1441 acctgccaat aaaaatttat ggtccaaggg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

KIT SuperScript™ First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen™ life technologies) para síntesis de cDNA mediante transcripción reversa. Con las siguientes especificaciones:

1. Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de usar.
2. Preparar una mezcla de RNA total/Iniciador en tubos estériles de 0.2 µL como sigue:

COMPONENTE	VOLUMEN
RNA (100ng)	xµL de acuerdo a la concentración
Mezcla de dNTP	1µL
Oligonucleótido (dT) ₁₂₋₁₈	1µL
Agua DEPC	Ajustar a 10µL

3. Incubar cada muestra a 65 °C en un termociclador (RoboCycler, Gradient40, Stratagene ®) durante cinco minutos y colocar en hielo.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción, adicionando cada componente en el orden indicado.

COMPONENTE	VOLUMEN
Amortiguador de síntesis de cDNA 10X	2µL
25 mM MgCl ₂	4µL
DTT 0.1 M	2µL
RNaseOUT™	1µL

5. Agregar 9 µL de la mezcla de reacción a cada mezcla de RNA total/oligonucleótido, mezclar gentilmente y centrifugar brevemente.
6. Incubar a 42 °C durante dos minutos en un termociclador (RoboCycler, Gradient 40, Stratagene ®).
7. Agregar 1µL (50 unidades) de SuperScript™ II “Reverse Transcriptase” a cada tubo e incubar a 42 °C durante 50 minutos.
8. Terminar las reacciones a 70°C durante 15 minutos. Colocarlas en hielo.
9. Centrifugar las reacciones. Agregar 1 µL de RNase H a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37 °C antes de proceder al qPCR. Almacenar a -30 °C.

qPCR

Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix- UDG Cat. No. 11733-038

1. Colocar 5 μL de cDNA no diluido o 10 μL de cDNA diluido generado a partir de 10 pg a 1 μg de RNA total.
2. Programar el aparato de qPCR (Rotor Gene) de la siguiente manera
 - a. 50°C por 2 minutos
 - b. 95°C por 2 minutos
 - c. 40 ciclos de
 - i. 95°C por 15 segundos
 - ii. 60°C por 30 segundos (60 segundos en el modelo 7900HT)
3. Preparar las reacciones en volúmenes de 50 μL por reacción. Para múltiples reacciones preparar master mix de componentes comunes.

Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix- UDG	25 μL
Forward primer, 10 μM	1 μL
Reverse primer, 10 μM	1 μL
ROX Referente Dye (opcional)	1 $\mu\text{L}/0.1 \mu\text{L}$
cDNA generado de 10 pg a 1 μg de RNA total	< a 10 μL
Agua DEPC	aforar a 50 μL

4. Tapar el tubo de reacción y mezclar gentilmente. Asegurarse que todos los componentes se encuentren en el fondo del tubo, si es necesario centrifugar brevemente.
5. Colocar las reacciones en el instrumento de qPCR pre-programado.
6. Colectar datos
7. Analizar resultados

ANEXO 4. ESTADIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA

Tumor primario

Las definiciones para clasificar el tumor primario (T) son las mismas para la clasificación clínica y patológica. Si las mediciones son hechas por exploración física, el médico debe usar los estadios mayores (T1, T2 o T3). Si se realizan otras mediciones tales como la mamografía o estudio histopatológico puede usarse los subgrupos de los estadios mayores (30).

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

Ganglios linfáticos regionales
Clínico

NX	Ganglios linfáticos no pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos
N1	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, móviles ipsilaterales
N2	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, fijos o ganglios linfáticos mamarios internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares.
N2a	Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos
N2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos
N3	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares con o sin afección de ganglios linfáticos axilares
N3a	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales
N3b	Metástasis en ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos ipsilaterales
N3c	Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales
Patológico (pN)	
pNX	No pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
pN0	No hay metástasis a ganglios linfáticos histológicamente. Pruebas adicionales (moleculares o inmunohistoquímicas negativas).
pN0(i-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica negativa.
pN0 (i+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica positiva.
pN0 (mol-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. RT-PCR negativa.
pN0 (mol+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. RT-PCR positiva.
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y/o ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela pero no identificable clínicamente.
pN1mic	Micrometástasis (mayor de 0.2 mm y menor de 2.0 mm)
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o clínicamente con ganglios mamarios internos
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares
pN2b	Metástasis en apariencia clínica en ganglios mamarios internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares o metástasis a ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis clínicamente aparentes en ganglios mamarios internos ipsilaterales en presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada por un ganglio centinela sin afección clínica aparente.
pN3c	Metástasis en ganglios superclaviculares ipsilaterales

Metástasis a distancia

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

Clasificación por estadios

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