

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR DE CÁNCER  
DE MAMA**

**T E S I S**

que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

presenta:

**MCH PATRICIA LUJÁN GONZÁLEZ**

**Directora de Tesis: DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO**



**México, D.F. 2009**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO  
DE GENÉTICA MOLECULAR.**

**CON APOYO ECONÓMICO DEL PROYECTO SIP DEL IPN No. 20080768  
DE LA DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO.**

**LA SUSTENTANTE FUE BECARIA CONACYT EN EL PERIODO  
DE ENERO 2006 A ENERO 2007.**

## *Dedicatoria*

*Dedico este trabajo a mi amado esposo Fer,  
por ser un excelente amigo, un compañero ideal, crítico benévolo,  
que ha vivido esta experiencia conmigo durante todos estos años,  
que sin su gran ayuda y entusiasmo  
no hubiera sido posible.*

*A mi hermana Ana por ser la mejor amiga que tengo,  
por estar conmigo siempre y por enseñarme  
a ser fuerte.*

*A mis padres porque los quiero mucho.*

## *Agradezco...*

*Agradezco la fortuna de que el tiempo convergió en un mismo punto para que nos encontráramos Fer.*

*Amis Papas (Nieves y Pascasio) por ser como son, porque no sería lo que soy si ellos no existieran.*

*A Anipu por su gran cariño, apoyo y lo más importante por ser mi gran hermanita muy querida.*

*A Vic por cuidar a alguien muy especial y no darse por vencido por muy difícil que sea.*

*A Arturo porque si quieres continuaremos caminando juntos siguiendo esa pequeña luz que hay al final del túnel y que sí se puede todo en esta vida.*

*A Meche por creer en una idea y querer mucho.*

*A Arturito por ser una esperanza en la vida.*

*A Fany y Sebas por ser parte de mi familia.*

*A Irene por ser mi maestra y porque hemos aprendido juntas en el camino.*

*A César Augusto por el asilo en su lab en épocas difíciles.*

*A mis amigos Gris, Gina, Edgar, Fabi, Denison, Joge, Nelly, ahí Mine, Adriana Robles y Marco Cadena (por mostrarme un mundo nuevo), Luis, Ramón, Paquito, por ser simplemente mis amigos.*

*A Ismael Vásquez por su gran contribución en esta tesis.*

*A mis maestros del PIBIOM por darme algo de su esencia con sus enseñanzas.*

*A mis maestros de Acupuntura Humana por ayudarme con lo que me enseñaron a terminar mi otra meta.*

*A los alumnos del PIBIOM que estuvieron conmigo en diferentes momentos dándome su gran apoyo.*

*Al Universo, a mi Dios por haberme permitido conocerlos a todos.*

# COMITÉ TUTORIAL

---

## DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO

(PIBIOM, ENMH, IPN)

## ASESORES:

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

(IMSS, CMNSXXI, RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN

GENÉTICA HUMANA)

DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ

(PIBIOM, ENMH, IPN)

DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

(PIBIOM, ENMH, IPN)

DRA. LUZ MARÍA BARAJAS FARÍAS

(PIBIOM, ENMH, IPN)

# CONTENIDO

---

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1. CÁNCER</b>	1
1.1.1. Epidemiología de cáncer	4
1.1.2. Aspectos moleculares del cáncer	6
<b>1.2. CÁNCER DE MAMA</b>	
1.2.1. Definición	7
1.2.2. Epidemiología del cáncer mama (CM)	8
1.2.3. CM en México	10
1.2.4. Clasificación	14
1.2.5. Factores de riesgo para CM	17
<b>1.3. DIAGNÓSTICO</b>	
1.3.1. Autoexploración Mamaria	20
1.3.2. Examen clínico	20
1.3.3. Mastografía	20
1.3.4. Resonancia magnética	22
1.3.5. Ultrasonido	23
1.3.6. Biopsia	23
<b>1.4. TRATAMIENTO</b>	24
<b>1.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b>	24

1.5.1. Genes relacionados con CM	24
1.5.2. Marcadores moleculares de CM	26
1.5.2.1. Marcadores de proliferación	26
Ki-67	27
1.5.2.2. Marcadores pronósticos de CM	27
Receptores de estrógenos y progesterona	27
Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano	28
1.5.3. Canales iónicos como marcadores de cáncer	29
1.5.3.1. Papel fisiológico de los canales de K <sup>+</sup>	30
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>32</b>
2.1. Canal iónico HERG1	32
2.2. Cáncer y el canal HERG1	33
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	
5.1. Objetivo general	38
5.2. Objetivos específicos	39
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
6.1. Criterios de selección de las muestras de pacientes	
6.1.1. Criterios de inclusión	40
6.1.2. Criterios de exclusión	40
6.1.3. Muestras de control	40
6.2. Material biológico	40
6.2.1. Selección de pacientes y muestras clínicas	41
6.3. Extracción de RNA total	41
6.4. Retrotranscripción (Obtención de cDNA)	41

6.5. Valoración de la calidad del RNA	42
6.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	42
6.7. RT-PCR en tiempo real del gen de interés y el gen constitutivo	44
6.8. Inmunohistoquímica	44
6.9. Estrategia experimental	45
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
7.1. Muestras clínicas	46
7.2. Northern electrónico de HERG1	46
7.3. RT-PCR en tiempo real del gen constitutivo como control interno	47
7.4. RT-PCR en tiempo real del gen <i>HERG1</i> y <i>HERG1B</i>	48
7.5. Inmunohistoquímica del canal HERG1	54
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>77</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Fig. 1.</b> Capacidades adquiridas del cáncer	2
<b>Fig. 2.</b> Porcentaje de defunciones por tumores malignos por sexo según año de ocurrencia	4
<b>Fig. 3.</b> Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada género	5
<b>Fig. 4.</b> Esquema que muestra los diferentes tejidos que pueden ser afectados por cáncer en la glándula mamaria	7
<b>Fig. 5.</b> Incidencia y mortalidad mundial por cáncer en mujeres	8
<b>Fig. 6.</b> Distribución de la incidencia de CM en el mundo	9
<b>Fig. 7.</b> Distribución de la mortalidad por CM en México	11
<b>Fig. 8.</b> Número de defunciones de cáncer cervicouterino y CM en México de 1979-2006	12
<b>Fig. 9.</b> Tasa de mortalidad por CM en mujeres mexicanas mayores de 25 años	13
<b>Fig. 10.</b> Mortalidad por CM por grupos de edad	14
<b>Fig. 11.</b> Frecuencia de factores de riesgo	19
<b>Fig. 12.</b> La mamografía y la resonancia magnética	22
<b>Fig. 13.</b> Esquema que muestra el cromosoma 7	32
<b>Fig. 14.</b> Representación esquemática de cDNAs de HERG1 y HERG1B	32
<b>Fig. 15.</b> Representación de la interacción de SYBR Green con el DNA de doble cadena	43
<b>Fig. 16.</b> Diseño experimental	45
<b>Fig. 17.</b> Northen electrónico de EST en tejidos y órganos sanos	46

<b>Fig. 18.</b> Northern electrónico de EST en diferentes tipos de cáncer	47
<b>Fig. 19.</b> Detección de $\beta$ -actina humana y <i>HERG1B</i> en las muestras de CM mediante PCR en tiempo real	48
<b>Fig. 20.</b> Proporción de expresión de la isoforma <i>HERG1B</i> en CM	49
<b>Fig. 21.</b> Gráfica con los niveles de sobreexpresión en PCR en tiempo real de <i>HERG1B</i> como T/N	50
<b>Fig. 22.</b> Distribución de las muestras con sobreexpresión de <i>HERG1B</i> por PCR en tiempo real de acuerdo al diagnóstico histopatológico	51
<b>Fig. 23.</b> Tipo de CM ductal con sobreexpresión de <i>HERG1B</i> por PCR en tiempo real	51
<b>Fig. 24.</b> Distribución de las muestras de CM con sobreexpresión de <i>HERG1B</i> por PCR en tiempo real	52
<b>Fig. 25.</b> Inmunohistoquímica para la proteína HERG1	54
<b>Fig. 26.</b> Inmunohistoquímica para la proteína HERG1	55

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Estadificación del CM	15
Tabla 2. Clasificación histopatológica del CM de acuerdo a la OMS	16
Tabla 3. Factores genéticos de predisposición al CM	25

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i> , Comité Unido Americano en Cáncer
<b>CDIS</b>	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
<b>CM</b>	Cáncer de Mama
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular)
<b>RE</b>	Receptor para Estrógenos
<b>RHNM</b>	Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>RP</b>	Receptor para Progestágenos
<b>TNFR1</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor type 1</i> (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo 1)

## RESUMEN

---

En el mundo, el cáncer es uno de los principales problemas de salud. El CM es la causa más común de muerte por neoplasias en mujeres en todo el mundo. En México, los tres principales tipos de cáncer en mujeres que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cuello uterino (12.1%) e hígado (7.6%).

Hasta el momento, existen pocos marcadores moleculares de cáncer aplicados en la práctica clínica, por lo cual hay una imperiosa necesidad para encontrar biomarcadores, en particular para el CM y que pudieran ayudarnos a detectarlo en etapas pre-invasivas o tempranas. Se ha reportado que el canal iónico HERG1 juega un papel importante en diferentes tipos de neoplasias, en las cuales se ha encontrado sobreexpresado. La sobreexpresión de *HERG1* se ha establecido como marcador de algunas neoplasias como cáncer de colon y leucemias y se ha relacionado directamente con la invasividad de las neoplasias.

Por lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo el análisis de la expresión del canal iónico HERG1 ( $K_v11.1$ , KCNH2) por PCR cuantitativa en biopsias de CM de pacientes, estudio que hasta el momento no se ha realizado. Los resultados que se obtuvieron con PCR tiempo real fue: se analizaron 39 muestras de CM, las cuales se pueden clasificar por su grado histológico en: Grado I, 13 muestras (41%), Grado II, 16 muestras (50%) y Grado III, 3 muestras (9%). Todas las muestras estudiadas amplificaron con el gen de control interno de la reacción de la qPCR,  $\beta$ -actina humana, de las cuales se encontraron 32 muestras positivas para *HERG1B* (82%) y 7 muestras negativas (18%). De las 32 muestras positivas a *HERG1B* con PCR en tiempo real, 29 muestras tienen el diagnóstico histopatológico de CM Ductal (91%) y 3 tienen el diagnóstico histopatológico de CM lobulillar infiltrante (9%). De las 27 muestras positivas con diagnóstico histopatológico de CM Ductal a *HERG1B* con PCR en tiempo real, 27 muestras fueron CM ductal infiltrante (93%) y 2 muestras fueron CM ductal *In Situ* (7%). El

porcentaje de muestras de CM positivas a nuestro marcador fueron un poco más alto que los reportados con otros marcadores del mismo tipo (canales iónicos) en cáncer como: *TRPM8* en cáncer de próstata, que con PCR en tiempo real se reportó una tasa de positividad del 64%. En cáncer colo-rectal, se obtuvo una tasa del 60% del gen *HERG1* y en gliomas primarios se obtuvo cerca del 80%, usando PCR convencional. Por inmunohistoquímica, la proteína de HERG1B se encontró sólo en las células tumorales de CM. Es indudable que la expresión de *HERG1B* está afectada en el CM, por lo que se debe de estudiar a fondo para determinar de qué manera afecta el proceso de carcinogénesis. Este trabajo es innovador ya que este gen aun no se ha reportado en CM.

# ABSTRACT

---

Cancer is one of the main health issues worldwide. Breast cancer (BC) is the most frequent death cause by neoplasia in women all over the world. In Mexico, the three most important cancer types that caused death in women during 2007 were: breast cancer (13.8%), cervical cancer (12.1%) and liver cancer (7.6%).

Until now, there are a few molecular markers for cancer applied to the clinical practice, therefore, there is a vital need to find cancer biomarkers specifically, for BC that can help us to detect it in early or pre-invasive stages. It has been reported the overexpression of *HERG1* ion channel in several neoplasias, which suggests strongly that it has an important role in cancer. In fact, it has been established as a cancer biomarker in some leukemias and colon cancer, as well as its direct relationship with cancer invasiveness.

For this, we perform the analysis of the *HERG1* channel (*K<sub>v</sub>11.1*, *KCNH2*) gene expression by quantitative PCR in biopsies from breast cancer patients, that has never been done before. The results are: 39 BC samples were analyzed, that can be classified according to their histological grade in: Grade I, 13 samples (41%); Grade II: 16 samples (50%) and Grade III: 3 samples (9%). All 39 analyzed samples amplified with the inner qPCR reaction control gene for human  $\beta$ -Actin, from which 32 samples were positive for *HERG1B* (82%) and 7 were negative (18%). 32 from the 29 samples positive to *HERG1B* have the histopathological diagnosis of ductal BC (91%) and 3 were classified as infiltrating lobular carcinoma (9%). The rate of BC samples positive to our marker was higher than that reported with other markers of the same kind (ion channels) in cancer such as: *TRPM8* in prostate cancer with a 64% of positives with qPCR. In colon cancer, *HERG1* had a rate of 60% and 80% for primary glioma, by conventional PCR. By immunohistochemistry assays, the *HERG1B* protein was detected only in breast cancer cells. It is unquestionable that the *HERG1B* gene expression is affected in

the BC, for this reason, its has to be analyzed in depth to determine in which way it affects the carcinogenesis process. This thesis work is innovative, as this gene has not been reported before as a marker in BC.

Words keys: Breast cancer, HERG1 channel, molecular diagnosis.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 CÁNCER

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en el mundo. Se estima que en 2008 hubo alrededor de 7.6 millones de muertes por esta neoplasia y que hay más de 12.4 millones de nuevos casos, además de los 25 millones de personas que padecen esta enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015<sup>1</sup>.

El cáncer es una enfermedad compleja que comprende alteraciones que pueden ser congénitas y/o adquiridas, en genes involucrados en la proliferación, apoptosis, reparación del DNA, envejecimiento celular y en genes relacionados con los procesos de angiogénesis, invasión, motilidad y adhesión, cuya expresión cuantitativa y cualitativa confiere a la célula características fenotípicas y biológicas de malignidad en grado variable según particularidades biológicas del tumor, anatómicas por su ubicación y generales del hospedero. Ya que, además de la dependencia del cáncer respecto del huésped para su irrigación sanguínea, su crecimiento es afectado por hormonas, fármacos y competencia inmunológica del paciente<sup>2</sup> (Fig. 1).

En el cáncer, el organismo produce un exceso de células malignas (conocidas como cancerígenas o cancerosas), con crecimiento y división más allá de los límites normales, (invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis). La metástasis es la propagación a distancia, por vía fundamentalmente linfática o sanguínea, de las células originarias del cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino<sup>2</sup>.



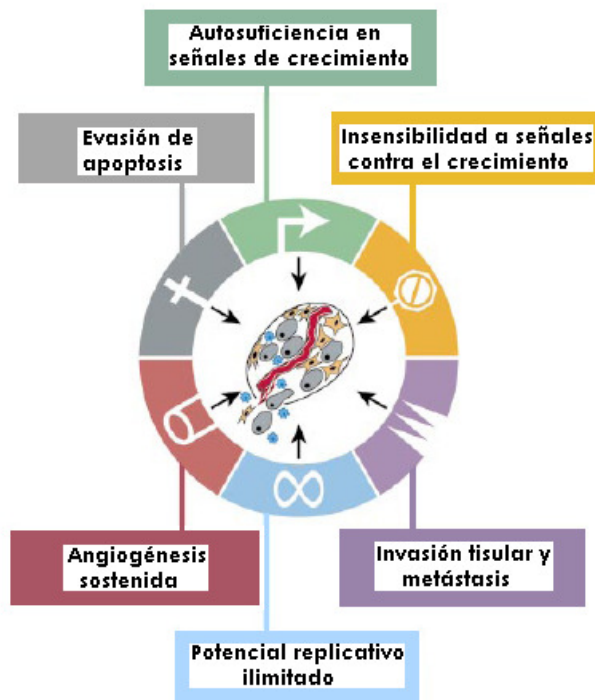


Fig. 1. Capacidades adquiridas del cáncer. Se sugiere que la mayoría de las neoplasias adquieren el mismo grupo de capacidades funcionales durante su desarrollo, a través de diferentes mecanismos (Modificada de Hanahan D y Weinberg RA<sup>2</sup>).

En el cáncer, las células no responden a las señales que controlan el crecimiento celular y proliferan en forma excesiva. Las células neoplásicas crean su propio mecanismo de nutrición formando factores de angiogénesis. El tiempo de crecimiento de los distintos tipos de tumores es variado, cuando el tumor no sobrepasa la membrana basal de los epitelios se llama *In Situ*, cuando llega a destruir esta membrana basal comienza la invasión a otros órganos provocando la metástasis<sup>2</sup>.

Existen varios tipos de cáncer, siendo tres los principales subtipos: el primero es el carcinoma, es un cáncer que empieza en la piel o en los tejidos que revisten o cubren las cavidades (ó los órganos internos) de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Este tipo de cáncer es uno de los más frecuentes, a las neoplasias de estructura similar al epitelio de la piel se le denominan carcinomas

de células escamosas y a los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. El segundo subtipo son los sarcomas que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos, tejido adiposo u otro tejido de sostén. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y los linfomas. La leucemia es un cáncer que comienza en un tejido donde se forman las células sanguíneas, como la médula ósea, donde se generan estas células malignas que pasan a la sangre. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que se originan de las células del sistema inmunitario. Producen inflamación o infiltración de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. Además, existen cánceres del sistema nervioso central que empiezan en los tejidos del cerebro y la médula espinal<sup>3</sup>.

La detección clínica de un tumor ocurre generalmente después de un período de latencia de varios meses o años. Las lesiones genéticas producen en el paciente la evolución del cáncer responsable de la aparición de uno o más tumores en la vida del enfermo, con progresión y pronóstico variables. Esta enfermedad en etapas avanzadas, según las estadísticas, es incontrolable y fatal en la mayoría de los casos<sup>3</sup>. La identificación de los genes implicados en la carcinogénesis o en procesos asociados a ésta, permitirá conocer mejor la etiología del cáncer y establecer nuevas estrategias para su diagnóstico, tratamiento y prevención.

La causa del cáncer es desconocida, aunque se reconocen diversos factores de riesgo que propician su aparición. El envejecimiento, el tabaquismo, la exposición solar o a diversos agentes químicos, el sedentarismo y la dieta son factores que, en ciertos casos, se identifican como factores de riesgo para desarrollar cáncer<sup>5,6</sup>.

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX convirtiéndose en un problema de salud pública en el mundo no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo -individuales y ambientales- con los que se asocia<sup>7</sup>. El cáncer puede afectar a personas de todas las edades, pero el riesgo aumenta conforme se va incrementando la edad. El cáncer causa cerca del 13% de todas las muertes en el mundo. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, 7.6 millones de personas murieron de cáncer durante el año 2007<sup>4</sup>.

En México, de 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse, siendo las mujeres las que presentan los porcentajes más altos en el periodo. Durante 2007, se registraron 514,420 defunciones, 55.4% de hombres y 44.6% de mujeres; de las cuales, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68,815 casos (13.4%), sólo por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas<sup>8</sup> (Fig. 2).

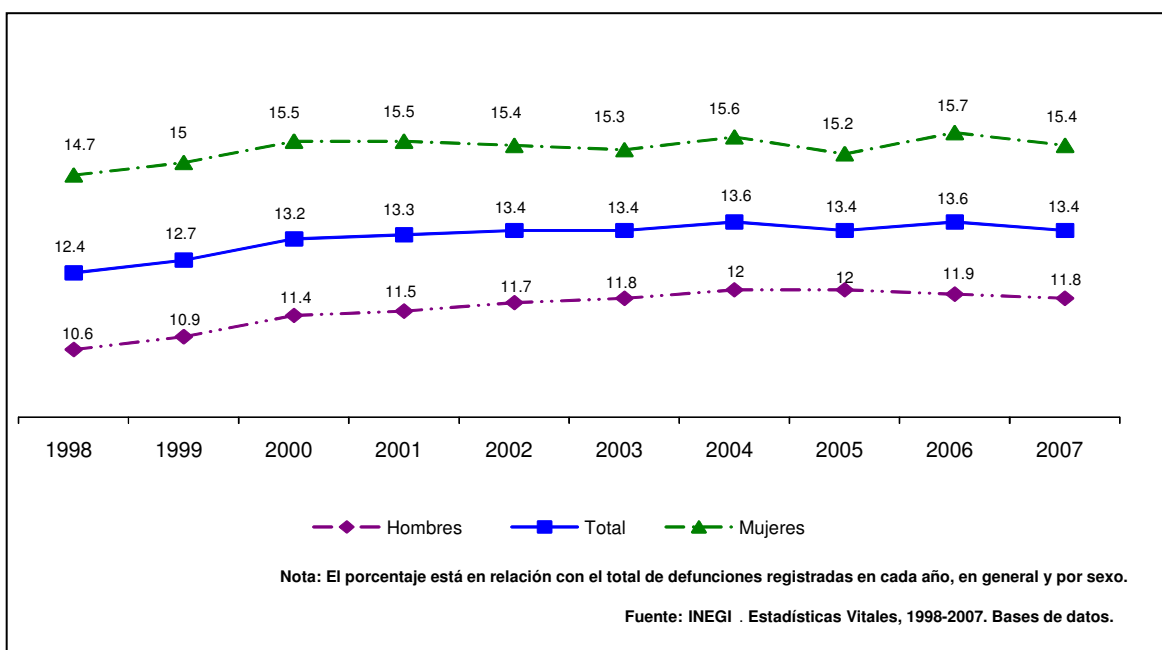
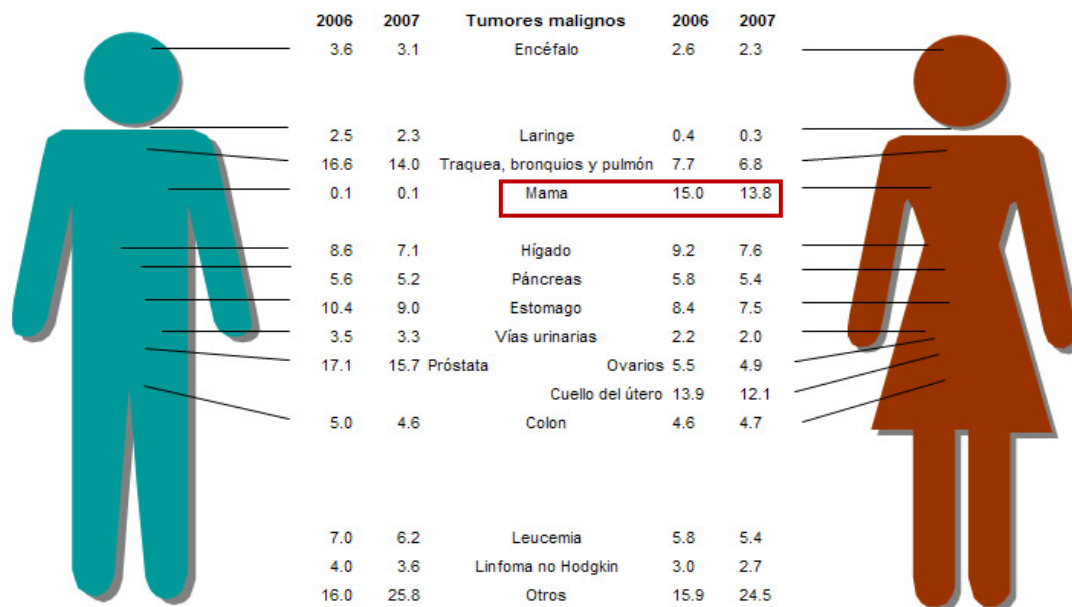


Fig. 2. Porcentaje de defunciones por tumores malignos por sexo, según año de ocurrencia (1998-2007).

Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia. En mujeres, los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cuello uterino (12.1%) e hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, éstos se continúan manteniendo en los primeros lugares<sup>8</sup>.

En los hombres, el cáncer de próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%) fueron las principales causas de muerte por neoplasias malignas durante 2007; al igual que en las mujeres, las prevalencias son similares a las de 2006, aunque el porcentaje de muertes que se les atribuyen ha disminuido<sup>8</sup>(Fig.3).



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006 y 2007. Base de datos.

Fig. 3. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada género.

### 1.1.2. ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER

La transformación maligna de las células normales se debe a la alteración de dos tipos de genes:

1. Oncogenes, que son los derivados de la alteración de los proto-oncogenes que son los encargados del crecimiento, desarrollo y diferenciación celular.
2. Genes supresor de tumor o anti-oncogenes, como su nombre lo indica, inhiben la expresión de estos genes<sup>9</sup>.

La mayoría de los tumores crecen a partir de la división de una célula madre, en la cual las mutaciones causan una inadecuada activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumor y de genes que regulan el desarrollo y reparación tisular, lo que explica porque un tumor está caracterizado por una proliferación desregulada, lo que resulta en un crecimiento anormal y una diferenciación irregular. Asimismo, el sistema inmunitario generalmente falla y no reconoce como extrañas a esas células anormales y no las elimina. De esta manera, los tumores experimentan progresión, en la cual se hacen menos diferenciados y más agresivos con el tiempo, por el surgimiento de subpoblaciones celulares con nuevas anomalías genéticas que impiden el control del crecimiento y se conforma un tumor<sup>3</sup>.

La inestabilidad genómica que lleva a la inmortalidad y transformación celular es un mecanismo complejo que, entre otros defectos incluyen la desregulación de enzimas encargadas de la replicación del DNA o en las proteínas del aparato mitótico encargadas de la distribución correcta de los cromosomas en las células hijas, así como defectos en los puntos de control del ciclo celular y la sobreexpresión o mutación de factores de crecimiento<sup>10,11</sup>.

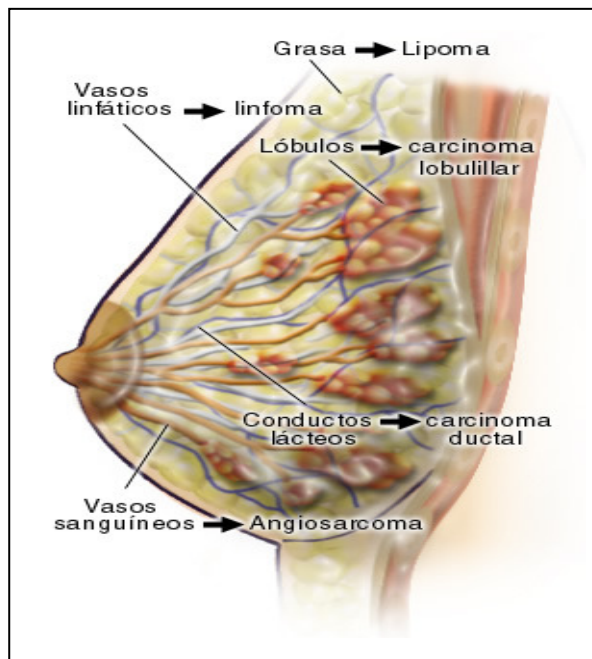
El cáncer es una sucesión de eventos en los cuales se cree que son necesarias de cinco a diez mutaciones acumuladas para que una célula evolucione de un fenotipo normal a otro totalmente maligno<sup>10</sup>.

## 1.2 CÁNCER DE MAMA

### 1.2.1 DEFINICIÓN

El cáncer de mama (CM) es una afección en la cual se forman células malignas en los tejidos de la glándula mamaria. Histológicamente esta estructura se compone por lóbulos y conductos, presentando cada una entre 15 y 20 lóbulos, los cuales comprenden secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lóbulos, los lobulillos y los bulbos están conectados por tubos delgados llamados conductos<sup>12</sup>.

El tipo más común de CM es el carcinoma ductal, que empieza en las células epiteliales de los conductos. El cáncer que se encuentra en los lóbulos o los lobulillos se llama carcinoma lobular o lobulillar y se encuentra con mayor frecuencia en ambas mamas en comparación con otros tipos de cáncer mamario<sup>12</sup>. (Fig. 4)



**Fig. 4. Esquema que muestra los diferentes tejidos que pueden ser afectados por cáncer en la glándula mamaria.**

## 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CM

El CM es la causa más común de muerte por neoplasias en mujeres en todo el mundo (Fig. 5). Se estima que las mujeres que llegan a los 85 años de edad tendrán una oportunidad en nueve de desarrollar esta enfermedad. Su frecuencia parece ser mayor en países desarrollados que en no desarrollados, pese a que el aumento paulatino de esta patología en estos últimos países ha hecho que esta diferencia sea cada vez menos marcada. Sin embargo, el grado de riesgo no es homogéneo entre la población en general. Mientras algunas mujeres nunca desarrollarán el CM, otras parecen tener un mayor riesgo de padecerlo<sup>5</sup>. Por ello, se ha vuelto cada vez más necesario ser capaz de valorar e individualizar, lo más preciso posible, el perfil de riesgo de una paciente a fin de poder asegurarle la mejor relación costo-beneficio de las alternativas de vigilancia y tratamiento disponibles.

Además, se ha documentado un incremento en la frecuencia y mortalidad en años recientes y por desgracia la mayoría se diagnostican en etapas avanzadas con probabilidades de curación del orden de 30 a 50% con predominio en mujeres jóvenes<sup>4</sup> (Fig. 5).

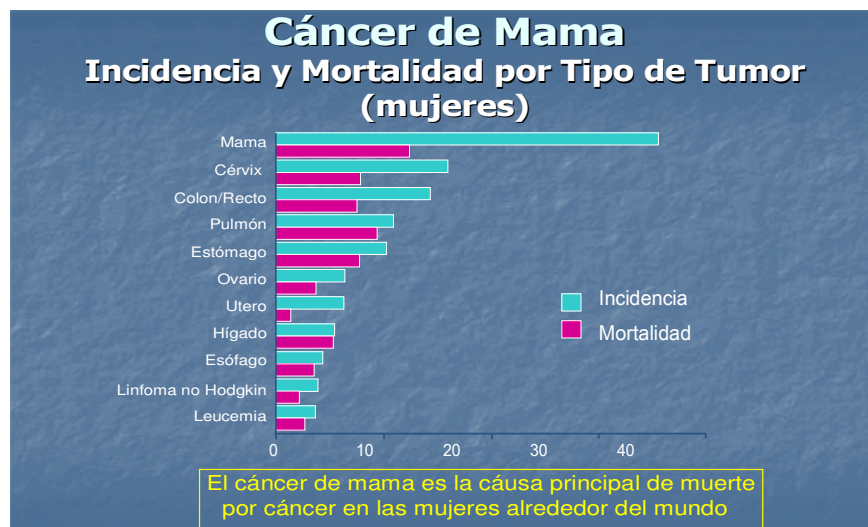
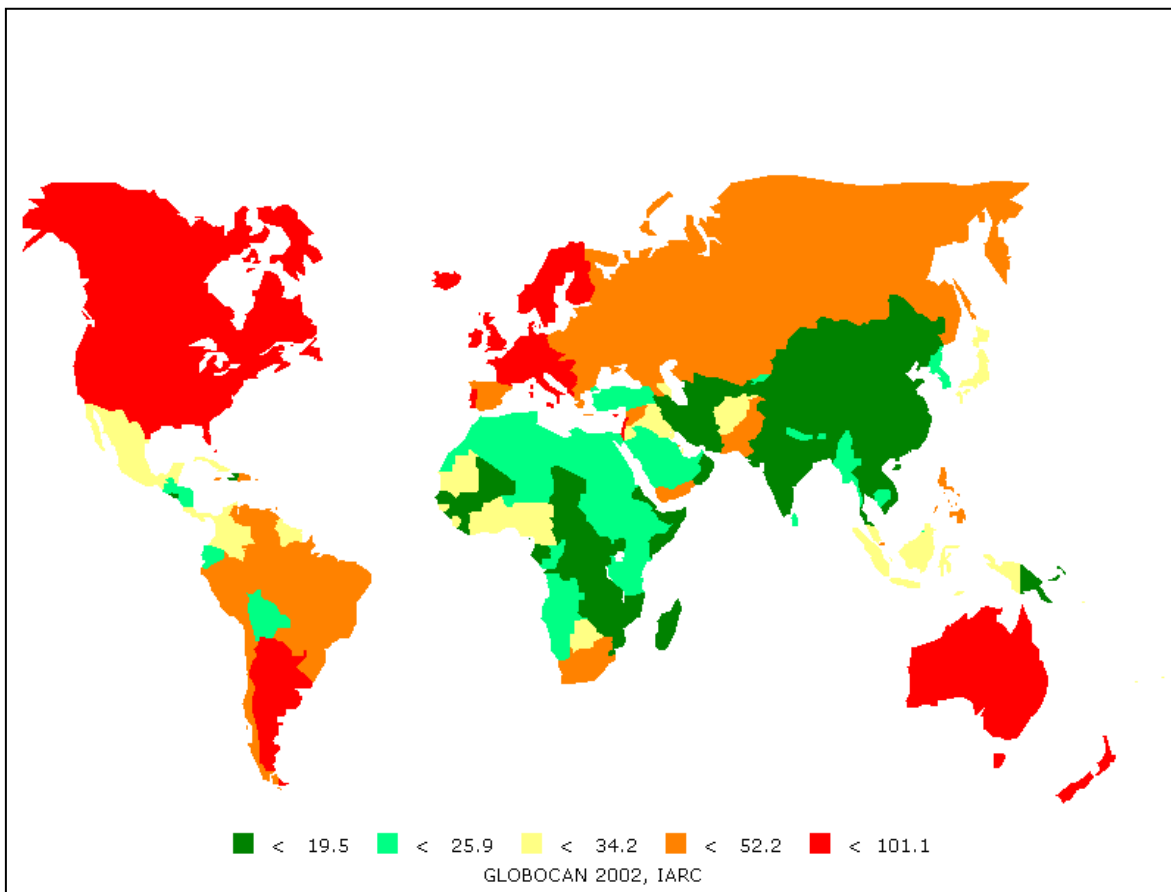


Fig. 5. Incidencia y mortalidad mundial por cáncer en mujeres. Fuente: OMS

Para el año 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que se diagnosticarían más de 1, 200,000 nuevos casos de CM (19% del total de cánceres en la mujer) <sup>14</sup>. Su frecuencia varía ampliamente y así los países norteamericanos y europeos son los que tienen la frecuencia más elevada, mientras que los países de Asia y África tienen la más baja. Los países latinoamericanos, en general, tienen una baja frecuencia, a excepción de Argentina y Uruguay con tasas semejantes a las de los países europeos <sup>15</sup> (Fig. 6).



**Fig. 6. Distribución de la incidencia de CM en el mundo. Tasa por 100,000. Fuente: International Agency for Research on Cancer (IARC), Globocan 2002.**



Este hecho es quizá explicable por la conformación mayoritaria de origen europeo en su población, a diferencia del resto de los países latinoamericanos donde el mestizaje entre indígenas, europeos y negros es la característica predominante. Es notorio que en todo el mundo hay un incremento en la frecuencia del CM y que este incremento es mayor en los países desarrollados, por ejemplo, en EUA el número de casos aumentó de manera progresiva de 1970 a 1997 en 161% (de 69,000 a 180,200) y el número de muertes por esa enfermedad en cerca de 50% (de 30,000 a 49,000)<sup>15,16</sup>. Este cambio, fue en gran parte debido al aumento del número de mujeres en riesgo, en particular mujeres de edad avanzada<sup>17</sup>, pero cuando se analiza la tasa de incidencia ajustada a la edad, ésta muestra un incremento anual de 1% de 1940 a 1980 y a partir de ese año el incremento se aceleró a 4% anual, estabilizándose en 111.3 casos por cada 100,000 habitantes a partir de 1995<sup>18</sup>. En el año 2007 se reportaron 178,480 de casos nuevos de CM en mujeres y 40,460 defunciones por esta causa<sup>4</sup>.

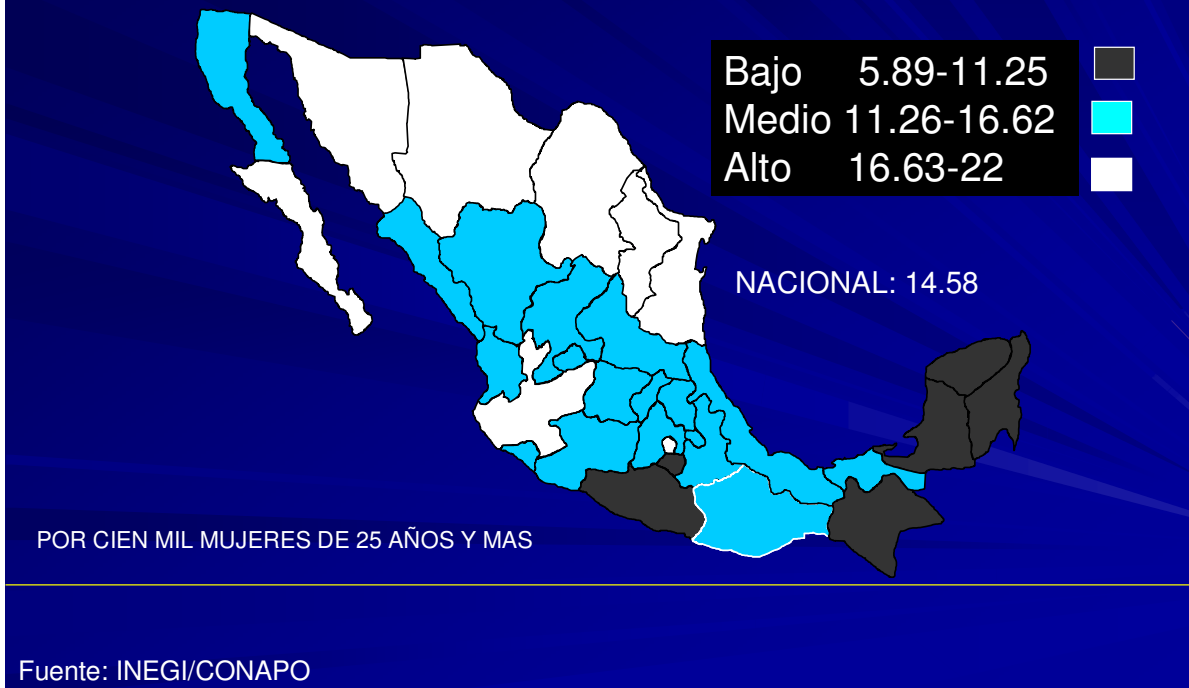
En años recientes se ha detectado un incremento paulatino del CM en muchos países asiáticos, en particular en Japón y Singapur, donde se ha producido un cambio del estilo de vida (“occidentalización”)<sup>19</sup> y hay evidencia que los descendientes de migrantes Hispánicos en los EUA tienen tasas de cáncer que se acercan a la de las mujeres blancas no-Hispanas debido a la transculturización<sup>20</sup>.

### **1.2.3. CM EN MÉXICO**

Este fenómeno también se presenta en nuestro país, al observar diferencias regionales importantes. En los estados del norte y centro del país, donde las mujeres gozan de un estado socioeconómico y cultural más elevado, con estilo de vida más semejante al de las mujeres de EEUU (tabaquismo, obesidad, sedentarismo, ingesta de alcohol y baja calidad de dieta), se detecta una mayor frecuencia de CM, mientras que en los estados donde predomina la población indígena y de menor nivel socioeconómico como Chiapas, Oaxaca y Yucatán, la frecuencia es mucho más baja<sup>21-23</sup> (Fig. 7).

# El Cáncer de Mama en México

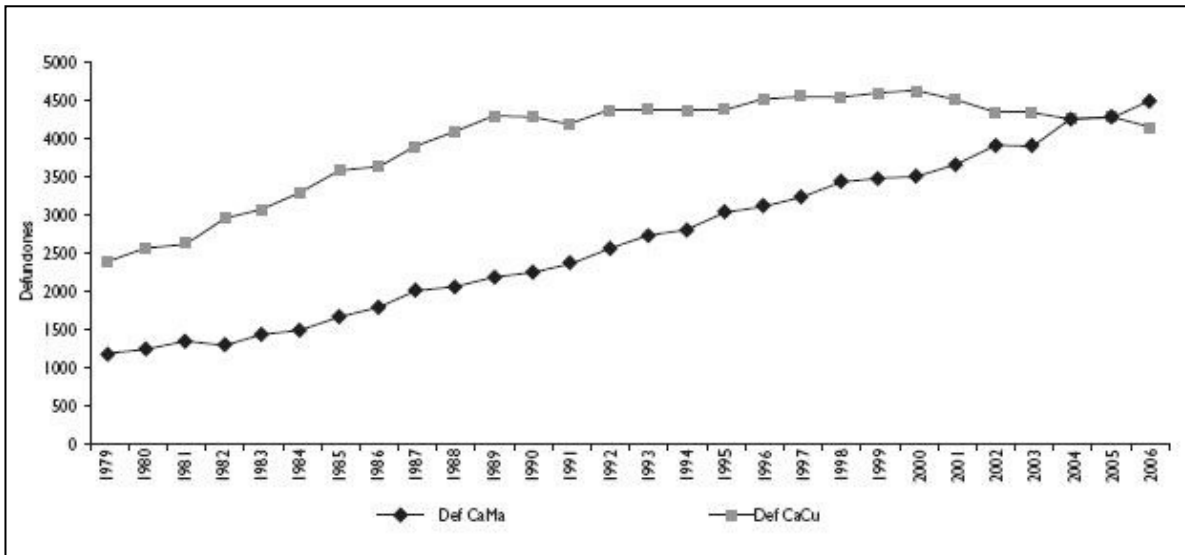
## Distribución Regional de Tasas de Mortalidad 2001



**Fig.7. Distribución de la mortalidad por CM en México. Fuente: INEGI/CONAPO, 2006<sup>21</sup>.**

En México, a partir de 2006, el riesgo de morir por cáncer de mama excede el cáncer cérvicouterino. En 1980 el cáncer cérvicouterino era dos veces mayor la mortalidad con respecto al CM en todos los grupos etarios. Aun cuando las muertes atribuibles tanto al cáncer cérvicouterino como al cáncer de mama se elevaron de manera sostenida a partir de la mitad del decenio de 1950 y hasta 1990, las tasas de mortalidad por cáncer cérvicouterino se elevaron mucho más que las del cáncer de mama, hasta alcanzar su punto más alto en 16 muertes por 100,000 mujeres. No obstante, desde 1990 las tasas de mortalidad por cáncer cérvicouterino comenzaron a descender con rapidez y esto continuó hasta el año 2006, llegando al punto más bajo de ocho muertes por 100,000. A lo largo del mismo periodo, las tasas de mortalidad atribuibles al cáncer de mama se

incrementaron para luego estabilizarse. Para el año 2006, las tendencias se habían cruzado y por primera vez el cáncer de mama superó al cáncer cervicouterino<sup>21,26,27</sup> (Fig. 8).

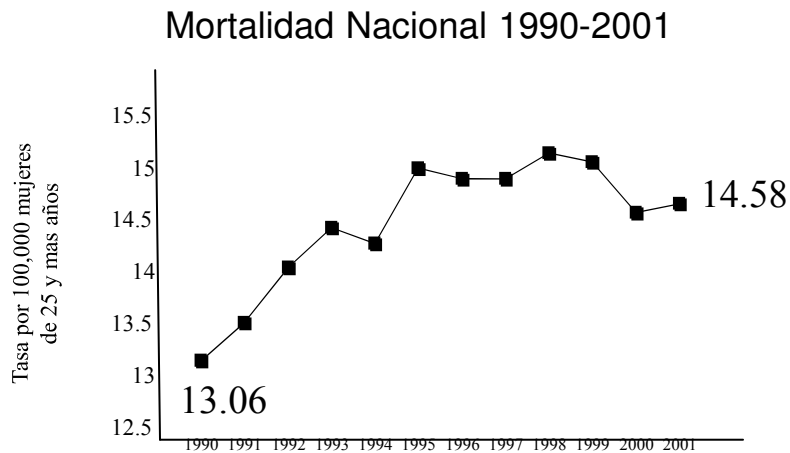


**Fig. 8. Número de defunciones por cáncer cervicouterino y CM en México de 1979-2006.**

**Fuente: Estadísticas vitales de mortalidad 1979'2006. INEGI/SSA<sup>21</sup>.**

En México, hay incluso estados donde el CM ha rebasado ya al carcinoma cervicouterino como primera causa de mortalidad en mujeres, como es evidente en el estado de Jalisco. En este estado, el CM ocupa el primer lugar desde 1997, con una tasa de mortalidad de 15.82 por 100,000 mujeres y donde la frecuencia del CM es ya casi similar (17.9 vs. 18.8) a la del cáncer cervicouterino<sup>23,24</sup>. La tasa de mortalidad por CM se ha elevado en México de 13.6 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años en 1990 a 14.58 por cada 100,000 en 2001<sup>22</sup> (Fig. 9).

## El Cáncer de Mama en México



**Fig.9. Tasa de mortalidad por CM en mujeres mexicanas mayores de 25 años (x 100,000).  
Fuente: INEGI/CONAPO<sup>22</sup>.**

En nuestro país, 47% de las muertes por CM ocurren en mujeres entre los 45 y 64 años, y la Secretaría de Salud calcula un promedio de 21 años de vida productiva perdidos por cada mujer con un impacto económico de 3,107,505,000.00 pesos en el 2001. Asimismo, se presentan casos de CM desde la segunda década de la vida y su frecuencia se incrementa rápidamente hasta alcanzar la máxima entre los 40 y 54 años y luego mostrar un descenso paulatino después de la quinta década<sup>22,28</sup> (Fig. 10). De particular interés ha sido el percatarse que en México la mujer desarrolla el CM en promedio, una década antes que las europeas o norteamericanas (51 vs. 63 años, respectivamente) hecho en parte explicable por la conformación de la pirámide poblacional mexicana, donde predominan las mujeres jóvenes<sup>28</sup>.

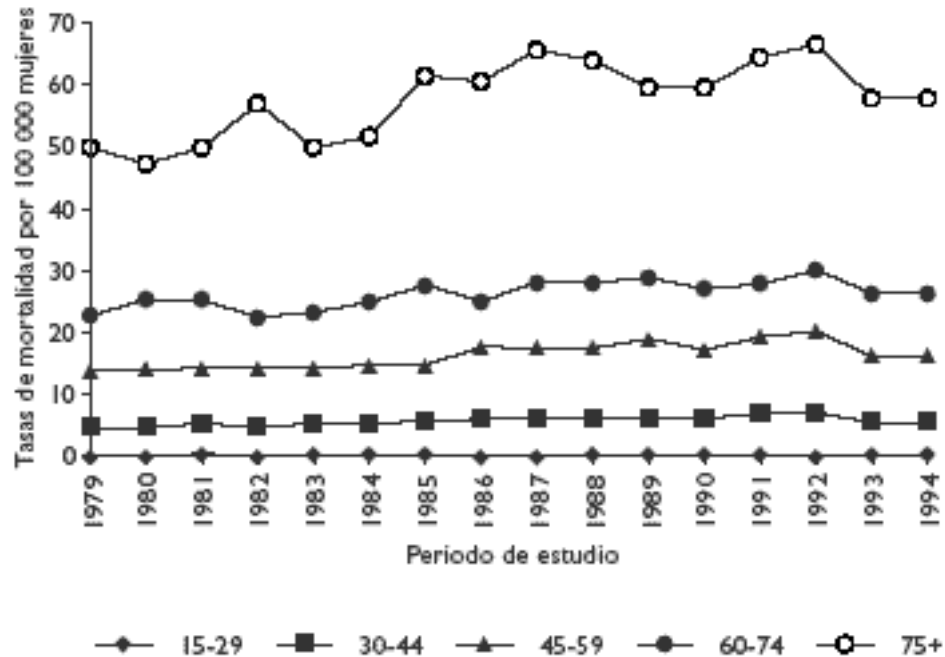


Fig. 10. Mortalidad por CM por grupos de edad. Fuente: Dirección General de Estadística e Informática. SSA<sup>29</sup>.

#### 1.2.4. CLASIFICACIÓN

Este sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) proporciona una estrategia para agrupar a los pacientes según el pronóstico. Las decisiones terapéuticas se formulan, en parte, de acuerdo con categorías de estadificación pero, principalmente, de acuerdo con el tamaño del tumor (T), el estado de los ganglios linfáticos involucrados (N) y la presencia o no de metástasis (también se consideran los receptores de estrógeno y progesterona en el tejido tumoral, el estado menopáusico y la salud general de la paciente) Tabla 1. Las definiciones para clasificar el tumor primario (T) son las mismas tanto para la clasificación clínica como la patológica. Si la medición se realiza mediante un examen físico, el examinador usará los títulos principales (T1, T2 o T3). Si se usan otras mediciones, como las mediciones mamográficas o patológicas, se pueden usar los subconjuntos de T1. Los tumores se deben medir redondeando la cifra según el incremento más cercano a 0,1 cm.

ESTADIO	TUMOR (T)	GANGLIO (N)	METASTASIS (M)
	TX (no se puede evaluar)	NX (no se pueden evaluar)	MX (no se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia)
0	Tis ( <i>In Situ</i> )	N0 (no hay metástasis)	M0 (no hay metástasis a distancia)
I	T1 (no mayor 2 cm)	N0	M0
II A	T0	N1 (metástasis a ganglio(s) linfático(s) axilar(es) ipsilateral(es) móvil(es))	M0
	T1	N1	M0
	T2 (mayor 2 cm menor 5 cm)	N0	M0
II B	T2	N1	M0
	T3 (mayor de 5 cm)	N0	M0
III A	T0	N2 (metástasis a ganglio(s) linfático(s) axilar(es) ipsilateral(es) fijo(s) o entretejido(s), o a ganglios mamarios internos ipsilaterales ausencia de metástasis clínicamente aparente en ganglio linfático)	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
III B	T4	N0, N1,N2	M0
III C	CUALQUIER T (cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica a la piel)	N3 (metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es), con compromiso de ganglio linfático axilar o sin este, o en ganglio(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente evidentes o metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es), con compromiso de ganglio linfático mamario axilar o interno, o sin este)	M0
IV	CUALQUIER T	CUALQUIER N	M1 (metástasis a distancia)

**Tabla 1. Estadificación del CM<sup>4</sup>.**

El AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) ha designado los estadios mediante la clasificación TNM<sup>107</sup>. Este sistema se modificó en 2002 y clasifica algunas categorías nodulares que previamente se consideraba que correspondían al estadio II, como estadio III<sup>108</sup>. Como resultado del fenómeno de migración de estadio, la supervivencia por estadio para series de casos clasificados con el nuevo sistema parecerá superior a aquella en la que se usa el sistema antiguo<sup>109</sup>.

La determinación correcta del estadio en los pacientes con CM reviste una extraordinaria importancia. No solo permite un pronóstico exacto, sino que en muchos casos la toma de decisiones terapéuticas se basa en gran medida a la clasificación TNM.

La Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup> utiliza una clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios (Norma Oficial Mexicana) Tabla 2.

<b>TIPO DE TUMOR</b>	
<b>NO INFILTRANTE</b>	<b>INVASOR</b>
Carcinoma lobulillar <i>In Situ</i> Carcinoma ductal <i>In Situ</i>	Carcinoma ductal invasor no específico (NTS) Carcinoma ductal invasor con extenso componente intraductal Carcinoma ductal invasor con enfermedad de Paget Carcinoma lobulillar invasor Carcinoma medular Carcinoma mucinoso o coloide Carcinoma papilar Carcinoma tubular Carcinoma adenoideo quístico Carcinoma secretor (juvenil) Carcinoma apocrino Carcinoma con metaplasia Tipo escamoso Tipo células fusiformes Tipo cartilaginoso y óseo Tipo mixto Carcinoma inflamatorio Otros

**Tabla 2. Clasificación histopatológica del CM de acuerdo a la OMS<sup>1</sup>.**

### 1.2.5. FACTORES DE RIESGO PARA CM

Una de cada ocho mujeres tiene riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida (12.2%) y una de cada 28 de morir por esta enfermedad. Los factores de riesgo más conocidos son los hormonales, genéticos y ambientales. Se han reportado como factores de riesgo:

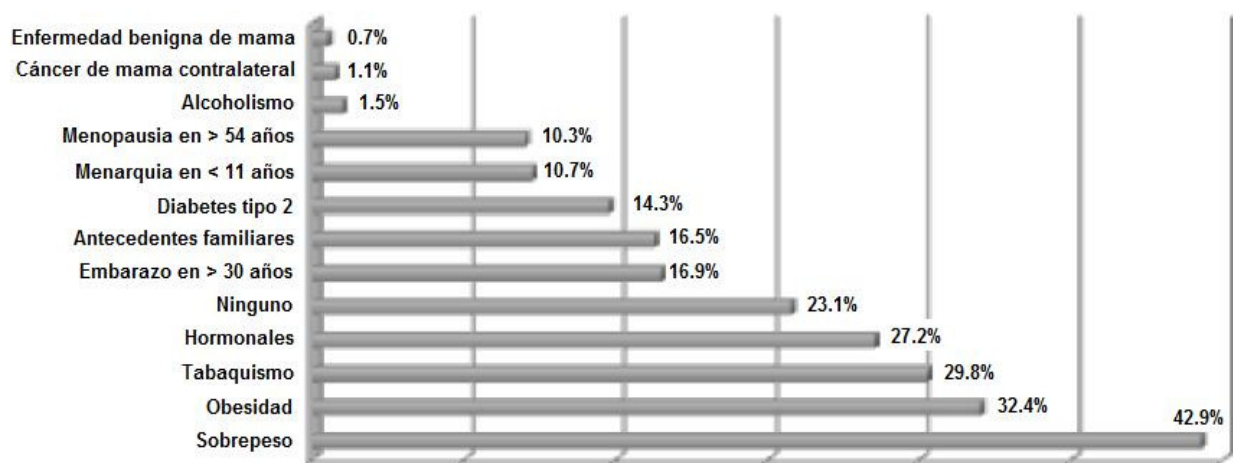
- *Edad avanzada.* El riesgo es mayor en las mujeres postmenopáusicas y se incrementa hasta los 70 años<sup>30</sup>.
- *Menstruación a temprana edad.* Cuanto más tarde sea la edad de presentación de la primera menstruación, más bajo será el riesgo de una mujer a sufrir CM<sup>31,32</sup>. Por cada año de retardo en la presentación de la menarca, el riesgo disminuye en cerca del 5%<sup>33</sup>.
- *Edad avanzada al momento del primer parto o ser nulípara.* Comparadas con las mujeres nulíparas, las mujeres que han tenido al menos un embarazo a término tienen en promedio, alrededor de un 25% de reducción en el riesgo de CM.
- *Antecedente de enfermedad mamaria proliferativa.* Son trastornos no cancerosos que pueden aumentar el riesgo de contraer CM, como: la hiperplasia ductal, la hiperplasia lobular y los papilomas. La hiperplasia moderada o florida, incrementa el riesgo 1.5 ó dos veces, la hiperplasia ductal o lobular atípica, lo aumenta cinco veces y el carcinoma *In Situ* ductal o lobular, lo aumenta a ocho a diez veces.
- *Genética.* La mayoría de los tipos de CM son esporádicos, solo el 5 y 10% son hereditarios. Se ha encontrado la relación entre algunas variantes genéticas y el CM, por ejemplo, las mutaciones hereditarias de los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53*, incrementan el riesgo de desarrollar CM 10 veces<sup>34</sup>.
- *Lactancia y multiparidad.* Han sido demostradas como factores que disminuyen el riesgo de CM, mientras que cuando tienen el primer



embarazo a término por arriba de los 30 años o son nulíparas, el riesgo de CM se eleva<sup>35</sup>.

- *Antecedentes familiares de CM.* Los familiares de primer grado de consanguinidad, confieren un incremento de riesgo de 1.5 a tres veces mayor, si son varios los familiares consanguíneos afectados, el riesgo puede elevarse hasta cinco a nueve veces más<sup>36</sup>.
- *Exposición a radiaciones.* Las mujeres expuestas a radioterapia o radiación tienen una mayor incidencia. El riesgo aumenta cuanto menor es la edad y mayor la dosis de radiación.
- *Ingesta de hormonas como estrógeno y progesterona.* El uso de estrógenos exógenos conjugados en la terapia hormonal de reemplazo, administrada por períodos prolongados (mayor a cinco años), así como el uso de combinación de estrógenos y progestágenos, continuos o secuenciales, incrementa el riesgo en 2% y 51%, respectivamente<sup>37-39</sup>
- *Estatura.* Mujeres cuya talla es mayor a 1.67 m. tienen un mayor riesgo que las que miden menos de 1.59 m. Mujeres altas y delgadas con mamas grandes tienen mayor riesgo, sobre todo antes de los 45 años<sup>40</sup>.
- *Ejercicio.* Algunos estudios han informado que la actividad física moderada está asociada con un menor riesgo de CM, sobretodo en mujeres premenopáusicas.
- *Dieta.* La mayor frecuencia de ésta enfermedad en Estados Unidos de Norteamérica y Europa y la baja incidencia en Asia y América Latina han sido correlacionadas con el mayor consumo de grasas animales y azúcares refinados en la dieta occidental<sup>41</sup>.
- *Obesidad.* Las mujeres que aumentan de peso más de 27 Kg. a partir de su juventud a la edad madura, doblan su riesgo de CM<sup>42</sup>.
- *Menopausia tardía.* La aparición a los 55 años o más incrementa 2.5 el riesgo, mientras que la menopausia artificial por castración quirúrgica, antes de los 40 años, ha mostrado disminuir significativamente el riesgo<sup>43</sup>.

En un estudio en México publicado en 2008, se identificaron los principales factores de riesgo de pacientes con CM. El 23.1% no tuvieron factores de riesgo, 64% tuvieron entre uno y dos, y 12.9% entre tres y cuatro factores. El grupo etario más frecuente fue de 50 a 59 años. Se registró 29.4% de mujeres menopáusicas, de las cuales el 35% eran mayores de 54 años de edad. Se encontró obesidad en 35% de las mujeres posmenopáusicas, tabaquismo en 29.8% y embarazo a término después de los 30 años en 16.9%. El 14.3% padecía diabetes antes del cáncer; 12% recibieron terapia hormonal por más de cinco años; menarquia antes de los 11 años en 10.7%. Se identificaron antecedentes heredofamiliares de primer grado en 6.6%. Los métodos de detección utilizados con mayor frecuencia fueron la autoexploración (91.5%), exploración clínica (7.4%) y mastografía (1.1%). La mama más afectada fue la derecha (53.3%), en comparación con la izquierda (46.7%). Este estudio demuestra que los factores preponderantes que aparecen más frecuentemente en nuestro medio fueron los ambientales, como el sobrepeso, la obesidad, el tabaquismo y la terapia hormonal. Es importante mencionar que en 23.1% de las pacientes no se identificó ningún factor de riesgo conocido<sup>44</sup> (Fig. 11).



**Fig. 11. Frecuencia de factores de riesgo. Modificada de Romero-Figueroa, 2008<sup>30</sup>.**

### **1.3. DIAGNÓSTICO**

El carcinoma de mama es la enfermedad más maligna en la mujer y es curable si se diagnostica en una etapa temprana<sup>45</sup>. Existen diferentes métodos y técnicas para realizar el diagnóstico de CM.

#### **1.3.1. AUTOEXPLORACIÓN MAMARIA**

Al realizar la autoexploración mamaria y encontrar una masa anormal, ayuda para que las pacientes acudan a revisión médica, siendo este el primer paso para mandar a realizar los estudios pertinentes. La evidencia disponible indica que la autoexploración mamaria tiene una sensibilidad de 26 a 41 % en comparación con el examen clínico y la mastografía<sup>46</sup>. Un estudio en México, concluyó que, dependiendo de la técnica de enseñanza, se logra que alrededor de 51 a 65 % de las mujeres identifique al menos abultamientos de 0.5 a 1 cm en el seno<sup>47</sup>.

#### **1.3.2. EXÁMEN CLÍNICO**

Se hace por medio de una historia clínica completa en donde el interrogatorio va dirigido a encontrar factores de riesgo, incluyendo una exploración física completa con mayor énfasis en la región de la glándula mamaria y ganglios linfáticos axilares. Solo el 60% de los tumores son palpables. Por lo cual se debe complementar con estudios de gabinete como la mamografía, entre otros<sup>47</sup>.

#### **1.3.3. MASTOGRAFÍA**

Es un estudio radiológico que se realiza para buscar en la mama anomalías (benignas o malignas) que no pueden ser detectadas por el examen físico. El examen regular consta de dos tomas en cada mama: la cráneo-caudal, que se hace de frente, y la oblicua, que se hace de perfil y permite ver la región glandular. Las impresiones se realizan una a la vez, ubicando el seno entre una placa metálica y una paleta compresora, que comprime la mama para lograr una buena

resolución. Aunque cuatro placas son suficientes, generalmente se realizan más, para explorar más de cerca alguna región que resulta sospechosa.

El uso de mastografía puede tener un impacto real en la disminución de mortalidad debido a la posibilidad de hacer diagnósticos de CM en fases más tempranas de la evolución de la enfermedad, lo que ha permitido, no solo disminuir la tasa de mortalidad, sino ampliar la utilización de tratamientos no mutilantes de la mama a un número cada día mayor de mujeres<sup>48,49</sup>.

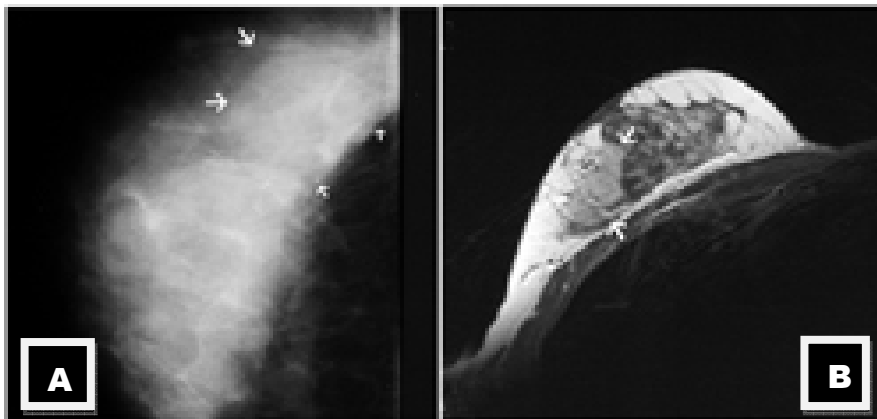
La sensibilidad de la mastografía para detección de CM varía de acuerdo con la edad de las pacientes, densidad del tejido mamario, tamaño de la lesión, estado hormonal del tumor, calidad técnica de la mastografía y experiencia de los radiólogos para interpretarla<sup>50</sup>. Por lo regular, la sensibilidad de la mastografía es de 77 a 95 %, con rango de 54 a 58 % entre las mujeres menores de 40 años (con mayor densidad del tejido mamario) y de 81 a 94 % entre mujeres mayores de 65 años<sup>51,52</sup>. Por esta razón, una mamografía negativa no descarta la presencia de carcinoma. Por otro lado, la tasa de mastografías falsas positivas fue mayor para las mujeres entre 40 y 59 años (7 a 8 %) que entre las de 60 a 79 años (4 a 5%)<sup>53</sup>.

La mastografía es el estudio estándar de oro actual disponible para poder reducir la mortalidad por CM a través del diagnóstico temprano. En las sociedades o en los países donde hay alta frecuencia de CM, o en los que la mortalidad por esta enfermedad constituya una de las principales causas de muerte entre las mujeres, como lo es en México y se tenga los recursos para hacerlo, el escrutinio con mastografía a la población en riesgo debe ser el primer método de control de CM<sup>54</sup>.

Cabe hacer notar que el 80% de los casos de carcinoma ductal *In Situ* (CDIS), el cual es el tipo más común de CM, se diagnostican solamente con una mastografía<sup>55</sup>.

### 1.3.4. RESONANCIA MAGNÉTICA

La resonancia magnética (RM) es un exámen que se utiliza en casos especiales, en los cuales ciertos factores dificultan ver claramente el tejido mamario en la radiografía. El estudio también se recomienda en pacientes bajo tratamiento de quimioterapia. La sensibilidad de la resonancia magnética es de 95% para CM, se indica a pacientes cuando la densidad de las mamas puede dificultar la detección de nódulos a través de la mastografía. La RM no debe ser usada en lugar de la mastografía, porque esta última detecta algunos cánceres que no se identifican con la RM. Por ejemplo, se ha reportado que la RM detectó 32 cánceres de mama pero dejó pasar 13. Ocho de los trece cánceres no detectados por la RM fueron hallados con la mastografía, entre ellos cinco casos de carcinoma ductal *In Situ* (CDIS) (Fig.12). De manera que si la RM se usara en lugar de la mastografía se podría pasar por alto una lesión que, con tratamiento, es esencialmente curable. En la otra punta del espectro, la RM conduce a muchos hallazgos falso-positivos en varias áreas de la mama en respuesta a cambios hormonales cíclicos<sup>56</sup>.



**Fig.12.** La mastografía y la resonancia magnética (RM) tienen diferentes virtudes y defectos en la detección precoz y el diagnóstico del CM. Aquí se pueden ver una mastografía (A) y una RM (B) de la mama derecha de una mujer de 56 años. Mientras que la RM detectó una masa (flecha en B), la mamografía detectó calcificaciones (flechas en A) que no se vieron en la RM.

### **1.3.5. ULTRASONIDO**

Es un estudio que se utiliza para diagnosticar y estadificar, pero aún no está clara su función para detectar en una etapa precoz. Es un exámen que permite explorar el tejido glandular de la mama, sirve para complementar la información del examen físico y de la mamografía, pero jamás la sustituye. Gracias a este estudio se puede saber la naturaleza de un nódulo: sólida o líquida y, si es necesario, permite al especialista indicar la realización de una biopsia que estudie en profundidad la lesión hallada<sup>57</sup>.

### **1.3.6. BIOPSIA**

La biopsia asociada al estudio histopatológico determina si el nódulo es benigno o maligno. Se trata de una extracción de células o tejidos para su exámen histopatológico. El patólogo puede estudiar el tejido bajo un microscopio o someter las células o el tejido a otras pruebas. Hay muchos tipos diferentes de biopsias. Las más comunes son:

1. Biopsia por incisión, en la que se extrae sólo una muestra del tejido.
2. Biopsia por escisión, en la que se extrae por completo una masa o un área sospechosa<sup>148</sup>.
3. Biopsia de aguja, en la que se extrae una muestra de tejido con una aguja. Cuando se usa una aguja ancha, el procedimiento se llama biopsia central. Cuando se usa una aguja fina, el procedimiento se llama biopsia por aspiración con aguja fina<sup>148</sup>.

La extracción con una aguja dirigida directamente al nódulo, cuya ubicación exacta es determinada por la mamografía o por el ultrasonido, o mediante una operación ambulatoria que se realiza con anestesia local. Por su alta sensibilidad y especificidad es un método de elección por su precisión diagnóstica<sup>58</sup>.

## 1.4. TRATAMIENTO

El tratamiento de la paciente se establece después de confirmar el diagnóstico de CM y de evaluar el estadio de la enfermedad.

El CM suele tratarse con diferentes combinaciones de cirugía, radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia. El pronóstico y la selección del tratamiento pueden estar determinados por la edad, la situación menopáusica de la paciente, el estadio de la enfermedad, el grado histológico y nuclear del tumor primario, la medición de su capacidad de proliferación<sup>59</sup>, así como por la presencia de algunos marcadores moleculares del CM como el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el gen *ERBB2* (Ver Sección 1.5.2.).

## 1.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 1.5.1. GENES RELACIONADOS CON CM

Las mujeres con antecedentes familiares de CM pueden tener un riesgo mayor de contraer la enfermedad<sup>60</sup>, lo cual confirma la existencia de factores genéticos involucrados en el CM. Hoy en día, se conocen tres grupos de factores de predisposición genética al CM basados en el riesgo relacionado con cada grupo (Tabla 3). El primer grupo de riesgo lo constituyen los genes de alta penetrancia relacionados con el CM de tipo familiar; que son los genes *BRCA1* (Breast Cancer 1) y *BRCA2* (Breast Cancer 2)<sup>61-64</sup>. Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* representan cada uno alrededor del 5 al 10% del riesgo relativo familiar para CM en la población caucásica<sup>65</sup>. Para una mujer con mutaciones del *BRCA1* y el *BRCA2*, el cálculo de riesgo de contraer CM en toda la vida oscila entre 40% y 85%. Las portadoras con antecedentes, de CM tienen mayor riesgo de contraer cáncer contralateral<sup>66</sup>. Además, los hombres portadores de mutaciones de estos genes también presentan mayor riesgo de padecer esta enfermedad<sup>67</sup>. Las mutaciones de cualquiera de estos genes también confieren un mayor riesgo de cáncer de ovario. Asimismo, los portadores de la mutación podrían tener un riesgo

mayor de contraer otros tipos de cáncer primarios<sup>68</sup>. Las mutaciones de estos genes se pueden determinar en los miembros de familias de alto riesgo por medio de métodos moleculares<sup>69,70</sup>.

Las mutaciones en el gen *P53* (gen supresor tumoral llamado así en referencia a la masa de su proteína que es de 53 Kilodaltones) dentro del marco del síndrome de Li-Fraumeni, también se consideran como de alta penetrancia, ya que las pacientes con este síndrome presentan un riesgo significativamente más elevado a padecer CM<sup>71</sup>, así como otros tipos de cáncer, los síndromes de Cowden, Peutz-Jeghers y el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario producidos por mutaciones en los genes *PTEN* (gen supresor tumoral, P<sub>3</sub> fosfatasa), *STK11* (gen supresor tumoral) y *CDH1* (E-caderina), respectivamente, se han identificado como capaces de conferir una mayor susceptibilidad a desarrollar CM. Sin embargo, las mutaciones en *P53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1* son muy raras en los tumores de mama esporádicos, por lo que su contribución al riesgo relativo fuera del contexto de sus síndromes adjuntos es muy baja<sup>72-76</sup>.

Penetrancia	Gen / Locus	Riesgo relativo	Frecuencia de portadores*	Metodología
Alta	BRCA1	>10	0.1%	Ligamiento
	BRCA2		Muy baja	Resecuenciación de genes candidato
Incierta	PTEN	2-10	Muy baja	Ligamiento
	STK11		Muy baja	
	CDH1		Muy baja	
Intermedia	ATM	2-3	0.4%	Resecuenciación de genes candidato
	CHEK2		0.4%	
	BRIP1		0.1%	
	PALB2		Muy baja	
Baja	10q26, 16q12, 2q35,	1.08-1.26	24-50%	Asociación de genoma completo
	8q24, 5p12	1.07-1.13	28-30%	
	11p15, 5q11	1.13	0.87%	

\*Los valores indicados se describieron sobre la base de la frecuencia de los polimorfismos en las poblaciones analizadas

**Tabla 3. Factores genéticos de predisposición al CM<sup>77</sup>.**



Por medio de la búsqueda de genes candidato se han identificado mutaciones en genes como *CHEK2* (gen supresor tumoral), *ATM* (gen de control del ciclo celular, llamado gen mutado de ataxia telangiectasia), *BRIP1* (repara el DNA, las siglas provienen de proteína 1 que interacciona con BRCA1) y *PALB2* (gen supresor tumoral, relacionado con BRCA2), los cuales pueden elevar el riesgo relativo de padecer la enfermedad de dos a cuatro veces<sup>78-81</sup>. Por otra parte, existe un polimorfismo codificante en el gen *CASP8* (gen de caspasa 8, esta implicado en la apoptosis) que se vincula con una reducción moderada del riesgo de padecer CM<sup>82</sup>. Sin embargo, la frecuencia de estas variaciones en la población general es baja y, aun si se consideran todos los genes de susceptibilidad conocidos hasta la fecha, todavía queda una proporción de 70 a 75% de los casos de CM que no presenta estas variantes genéticas<sup>83</sup>.

### **1.5.2. MARCADORES MOLECULARES DE CM**

Los marcadores moleculares de cáncer también llamados biomarcadores, son moléculas que se encuentran en sangre, otros fluidos biológicos o en tejidos como señales de un proceso anormal<sup>84</sup>. Los factores pronósticos se correlacionan con la sobrevivencia sin importar el tipo de terapia y se usan para seleccionar a pacientes en riesgo. Los factores predictivos se asocian con la respuesta a una terapia independiente del pronóstico y tienen un impacto en seleccionar éstas. Algunos marcadores moleculares pueden ser pronósticos, predictivos o ambos<sup>45</sup>. Algunos marcadores pronósticos bien caracterizados son: Ki-67, el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y ERBB2.

#### **1.5.2.1. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN**

La tasa de proliferación tumoral es un factor pronóstico importante en el CM. La Inmunohistoquímica (IHQ) detecta antígenos relacionados al ciclo celular y es apropiada para evaluar muestras pequeñas de tejido, por lo cual es la técnica usualmente seleccionada para la detección de estos marcadores.

**Ki-67.** Es un antígeno nuclear que se encuentra en las células en las fases proliferativas del ciclo celular (Fases G1, S, G2 y M), pero no en células en la fase de reposo G0. Pacientes con tumores que sobreexpresan Ki-67 en más del 50% de las células, están en riesgo de desarrollar cáncer recurrente. Asimismo, Ki-67 se correlaciona con otros marcadores de proliferación como el PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular)<sup>85</sup>.

#### **1.5.2.2. MARCADORES PRONÓSTICOS DE CM**

**Receptores de Estrógenos (RE) y Receptores de Progesterona (RP).** Las funciones del estrógeno son mediadas a través de dos receptores intracelulares específicos, el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ , que actúan como reguladores transcripcionales dependientes de hormonas<sup>86,87</sup>. La sobreexpresión del RE $\alpha$  está bien establecida como factor pronóstico en pacientes con CM. El valor pronóstico de RE $\beta$  no está bien definido aún<sup>146</sup>. El estado de los RE y RP se puede determinar usando IHQ<sup>88</sup>. Las pacientes positivas a RE reciben terapia hormonal adyuvante o paliativa. Se ha determinado que la presencia del RE es más importante para el pronóstico, que el tamaño del tumor en casos RE negativos<sup>89</sup>.

La sobreexpresión del RE $\alpha$  y RP en los carcinomas de mama se correlaciona con las neoplasias bien diferenciadas (bajo grado) y respuesta favorable al manejo con inhibidores de la aromatasa. El 60% de los pacientes cuyo tumor primario es RE (+) responde a la terapia hormonal; el 77% de los RE (+) y RP (+) también lo hace; igualmente se comportan el 27% de los RE (+) y RP (-) y 46% de los RE (-) y RP (+). Su presencia no garantiza una respuesta favorable y 33% de los pacientes con marcadores positivos no responden a la terapia<sup>90-93</sup>.

El tamoxifeno®, un antagonista parcial de la función del receptor de estrógeno, puede mediar la regresión tumoral del CM metastásico y prevenir la recurrencia de la enfermedad en condiciones coadyuvantes, salvando miles de vidas cada año. El tamoxifen se fija al receptor de estrógeno y modula su actividad transcripcional, inhibiendo su actividad en la mama, pero favoreciendo su actividad en el hueso y

el epitelio uterino, lo cual puede provocar tumores uterinos en un 10% de las pacientes tratadas<sup>110</sup>.

**Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (ERBB2/ Her2 neu).**

Es un proto-oncogen que codifica a una glicoproteína cinasa de tirosina de 185 KDa. Es una proteína que participa en el crecimiento normal de las células. La proteína ERBB2 se encuentra sobreexpresada en 60% de los CDIS (Carcinoma Ductal *In Situ*) y en 20-30% de los carcinomas de mama infiltrantes<sup>94,95</sup>. Se encuentra en algunos tipos de células cancerosas, como las de mama y ovarios. Los tumores de mama se pueden someter a la prueba de IHQ para verificar la presencia del ERBB2 y ayudar a decidir el mejor tipo de tratamiento. La expresión de ERBB2 se puede determinar por IHQ utilizando anticuerpos contra ERBB2 como HercepTest® (DAKO Corporación) o cerbB2/CB11. La interpretación se hace mediante una escala subjetiva que va de 0 a 3 (marcación de membrana) con equivalencia con la sobreexpresión génica. Si el tumor es 0 o 1 se considera ERBB2 negativo. Si es 2 o 3, se considera ERBB2 positivo y los pacientes pueden recibir terapia con trastuzumab<sup>105-106</sup>. La sobreexpresión de ERBB2 está asociada a una pobre tasa de supervivencia libre de enfermedad<sup>96-98</sup>. También su sobreexpresión se ha asociado a una respuesta buena a la quimioterapia basada en doxorubicina<sup>99-103</sup>. Existe correlación directa entre la expresión de ERBB2 y la resistencia a citoxano/metotrexato y tamoxifeno. Con tecnología recombinante se desarrolló un anticuerpo monoclonal humanizado contra ERBB2, conocido como trasztuzumab (huMAB HER-2, Herceptin®) que inhibe a ERBB2 y a su vez bloquea el crecimiento de la célula neoplásica<sup>104</sup>.

### 1.5.3. CANALES IÓNICOS COMO MARCADORES MOLECULARES DE CÁNCER

Un canal iónico es una proteína integral de membrana o la unión de varias proteínas homólogas que se reúnen alrededor de un poro. La subunidad que forma el poro se denomina subunidad  $\alpha$ , mientras que las subunidades auxiliares son denotadas sucesivamente con  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc. Mientras algunos canales permiten el paso de iones en función de su carga, el canal arquetipo tiene una anchura de sólo uno o dos átomos en su punto más estrecho. Éste actúa sobre un tipo específico de ion, como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$ , y los conduce a través de la membrana. En algunos canales iónicos, el paso a través del poro está gobernado por una "compuerta" que se abre o se cierra por medio de señales químicas o eléctricas, temperatura o fuerza mecánica<sup>111</sup>.

Los canales iónicos son especialmente importantes en la transmisión del impulso eléctrico en el sistema nervioso. De hecho, la mayor parte de las toxinas que algunos organismos han desarrollado para paralizar el sistema nervioso de depredadores o presas (p.e. el veneno producido por escorpiones, arañas, serpientes y otros) funcionan obstruyendo los canales iónicos. Los canales iónicos participan también en una gran variedad de procesos biológicos que requieren cambios rápidos en las células de tipo excitable, como: latidos del corazón, contracción del músculo, transporte de iones y nutrientes a través de epitelios, activación de linfocitos T o la liberación de insulina por las células beta del páncreas. Los canales iónicos son un objetivo clave en la búsqueda de nuevos fármacos<sup>112, 113,114</sup>.

Datos recientes demuestran que la expresión de ciertos oncogenes afecta directamente la función de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>115</sup> y que genes que codifican para proteínas de canales de  $\text{K}^+$  tienen potencial oncogénico por sí mismas<sup>116,117</sup>. Por otro lado, algunos genes que codifican para canales iónicos se han catalogado como genes supresores de tumor en neoplasias humanas<sup>118,119</sup>. Incluso, el patrón de expresión de canales iónicos está frecuentemente alterado en células

tumorales en comparación con células normales: varios tipos de canales de  $K^+$  y  $Na^+$  están sobreexpresados en células cancerosas y se ha demostrado una localización anormal de canales de  $K^+$  en tumores astrocíticos<sup>120</sup>. La contribución de los canales iónicos a fenotipos neoplásicos es diversa y la mayoría de los estudios se enfocan al papel de los canales, especialmente de  $K^+$ , en la regulación del ciclo celular<sup>120,121,122</sup>. Sin embargo, hay datos crecientes en relación a su papel en los cambios en el citoesqueleto e interacciones célula a célula<sup>123</sup>. Estos fenómenos representan los pasos iniciales que conducen al incremento de la motilidad celular, el cual es un prerrequisito para la invasión tumoral. También se ha reportado la interacción de canales iónicos con las integrinas<sup>120,123</sup>. De hecho, las integrinas son receptores de adhesión importantes en la metástasis tumoral<sup>124</sup>. Asimismo, cada vez se hace más claro que la invasión de células tumorales puede ser detenida con el uso de bloqueadores de canales<sup>125,126,127</sup>.

#### **1.5.3.1. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS CANALES DE $K^+$**

Los canales de  $K^+$  forman el grupo más heterogéneo de proteínas estructurales de la membrana. Se han identificado más de 200 genes que codifican diversos canales de  $K^+$ . Atendiendo al mecanismo de activación podemos subdividir los canales Kv en dos grandes grupos, ya sean activados por cambios de voltaje o por agonistas. Sin embargo, la clasificación más común es aquella que ordena los canales de  $K^+$  atendiendo a la topología de las subunidades  $\alpha$ , es decir, al número de poros y de segmentos transmembranales del canal (denominados S en los canales Kv y M en los canales activados por ligandos endógenos). En las células excitables, la despolarización celular activa los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (Kv) y facilita la salida de  $K^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización del potencial de membrana. Los canales juegan un papel importante en el mantenimiento del potencial de reposo celular, frecuencia de activación de las células automáticas, liberación de neurotransmisores, secreción de insulina, excitabilidad celular, transporte de electrolitos por las células epiteliales, contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular.

Los canales que se activan por cambios de voltaje (Kv) y los activados al aumentar la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (KCNM y KCNN) entre otros, pertenecen a la familia de canales  $\text{K}^+$  con seis segmentos transmembranales y poro (6TM-1P).

Los canales forman una estructura tetramérica, constituida por cuatro subunidades  $\alpha$ , que se unen entre sí en la porción citoplasmática del sarcolema formando homo o heterotetrámeros<sup>113,128,129</sup>.

Cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades  $\alpha$  están codificadas por el mismo gen, mientras que los heterotetrámeros están constituidos por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia<sup>128, 129</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. CANAL IÓNICO HERG (KCNH2)

El canal HERG1 (Human Ether a go-go Related, KCNH2) es un canal de K<sup>+</sup> dependiente de voltaje, monotetrámero. Esto significa que es capaz de sensar los cambios en el potencial de la membrana plasmática modificando su estructura conformacional y permitiendo (estado abierto) o impidiendo (estado cerrado o inactivado) el flujo iónico a través de ellos<sup>145</sup>.

El gen que codifica para cDNA este canal se localiza en el cromosoma 7q36.1 y tiene 15 exones y 3900 pb su RNAm (Fig. 14 y 15). El polipéptido consta de 1159 residuos aminoacídicos, tiene seis segmentos transmembranales y un poro entre el segmento cinco y seis.

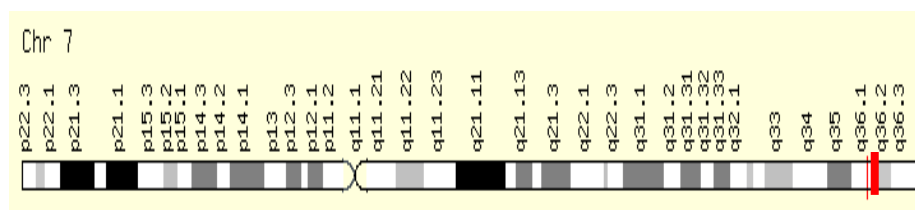


Fig. 13. Esquema que muestra el cromosoma 7 donde se encuentra localizado *HERG1* en el brazo largo en la región 36.1.

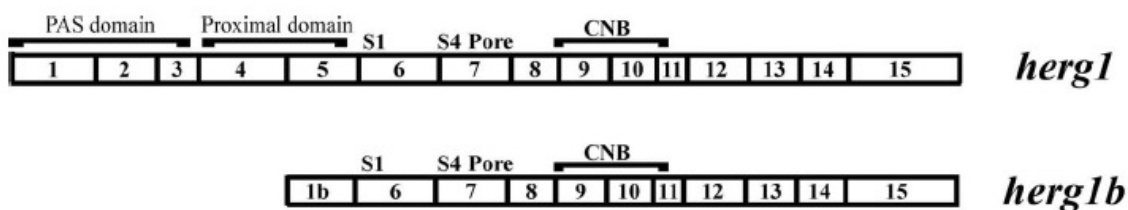


Fig. 14. Representación esquemática de cDNAs de *HERG1* y *HERG1B*. El número dentro del cuadro indica el número de exón.

## 2.2. CÁNCER Y EL CANAL HERG1

El gen *HERG1* (*KCNH2*) se ha encontrado sobreexpresado en varios tipos de líneas celulares tumorales como: neuroblastoma humano (SH-SY5Y), rhabdomiosarcoma humano (RD12), carcinoma de colon humano (H630), carcinoma de mama humano (SkBr3) y leucemia monoblástica humana (FLG29.1)<sup>131</sup>. También se ha encontrado sobreexpresado en varios tipos de tumores sólidos de humano como adenocarcinoma endometrial primario<sup>139</sup> y cáncer colorectal<sup>127</sup>, mientras el RNAm como la proteína se encuentran ausentes en hiperplasia y tejido normal. Es muy interesante que la más alta incidencia de la expresión del gen *HERG1* se ha observado en cáncer metastásico como cáncer gástrico primario, gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas) y sarcomas<sup>10</sup>. Recientemente se ha reportado<sup>140</sup> que la cisaprida (un potente bloqueador de canales relacionados a ether a go-go), puede inhibir el crecimiento de células de cáncer gástrico alterando el ciclo celular e induciendo apoptosis<sup>140</sup>.

Los mecanismos de HERG en el control de la proliferación celular fueron estudiados en células de leucemia: al inhibir el canal HERG con un bloqueador específico se observó un retraso en la progresión del ciclo celular que puede atribuirse a la acción del bloqueador en las células que están en la fase G1 del ciclo celular<sup>132,133</sup>. Muchas células tumorales, especialmente células de leucemia, expresan una isoforma truncada en el extremo N terminal, denominada *HERG1B* junto con la proteína *HERG1*<sup>13,132</sup>, lo cual sugiere que la isoforma *HERG1B* puede estar implicada en la regulación de la proliferación celular. Este efecto antiproliferativo que se observa al inhibir HERG solamente se ha reportado en líneas celulares de humanos que expresan *HERG1B* junto con *HERG1* en leucemia<sup>132</sup> y neuroblastoma<sup>131</sup>.

Esta proteína *HERG1B* es expresada sobre la membrana plasmática de células tumorales y forma heterotetrámeros con la proteína de *HERG1*. La expresión de las dos isoformas sobre la membrana plasmática está presente durante el ciclo



celular de las células tumorales. De forma interesante, las propiedades biofísicas de HERG1B facilitan la despolarización celular en comparación con HERG1<sup>9</sup>.

En la mayoría de las leucemias del tipo mielóide aguda primaria humana (LMA) se encontró expresión del transcrito *HERG1B*, destacando la participación de esta variante de “splicing” en los tumores hematopoyéticos. También, las proteínas HERG1 y HERG1B pueden ser detectadas dentro de células inmaduras de LMA, con un patrón peculiar de expresión limitado a las células de blastocitos<sup>132</sup>. Este dato fue confirmado por el grupo de Dr. Schlichter<sup>133</sup> que demuestra que las isoformas genes *HERG1* y *HERG1B* también son sobreexpresadas dentro de blastocitos periféricos de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Los canales HERG contribuyen a mantener más despolarizado el potencial de membrana (una característica de las células tumorales) y permite la progresión del ciclo celular. La sobreexpresión de *HERG1* en tumores puede desarrollarse por la interacción de varias proteínas involucradas en el control de la proliferación. En un reporte reciente, se demuestra que el oncogen v-src (un gen constitutivo activo que codifica para la proteína tirosina cinasa scr) puede fosforilar el canal HERG y así inducir un incremento en la corriente<sup>130</sup>. De hecho, la función aberrante de las proteínas dentro del camino de la señalización de ras-src es una característica común para la transformación de las células, la modulación mediante src puede ser un mecanismo que regula la función de HERG dentro de las células con cáncer. Otro estudio muestra que el canal HERG sobreexpresado en líneas celulares tumorales y tumores primarios fue preferentemente formado por un heterotetrámero del gen *HERG* y la variante de splicing alternativo *HERG1B*. Las propiedades biofísicas resultantes del canal heterotetramérico resultaron ser muy diferentes de las del homotetrámero de HERG1 dentro de células normales. Además, la expresión de las dos isoformas de HERG1 fue marcadamente dependiente del ciclo celular<sup>131</sup>. También, se encontró interacción de HERG1 con un adaptador de proteínas 14-3-3, una familia conservada de proteínas involucradas con la regulación del control del ciclo celular, adhesión y apoptosis<sup>137</sup>.

HERG1 ha mostrado interacción física con la proteína integrina Beta1 (molécula importante en metástasis tumoral) y modula la adhesión de integrina dependiente de la señalización<sup>138</sup>.

Se ha observado que el promedio de sobrevida se acorta significativamente en pacientes con leucemia aguda<sup>149</sup>, carcinoma epidermoide de esófago<sup>153</sup>, carcinoma gástrico<sup>154</sup> cuando la sobreexpresión de HERG1 es positiva, en comparación al grupo de pacientes donde HERG1 fue negativo, por lo anterior fue identificado como un marcador pronostico desfavorable.

Todo esto revela el papel que juegan los canales ether a go-go en la proliferación celular y su posible utilización como genes y proteínas marcadores de cáncer. El papel de este canal en el desarrollo de CM no ha sido evaluado hasta el momento.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

El CM es un gran problema de salud pública ya que es la primera causa de muerte por cáncer en nuestro país, en especial en el grupo de mujeres en etapa reproductiva.

Existen pocos marcadores moleculares de CM aplicados en la práctica clínica, por lo cual hay una imperiosa necesidad para encontrar moléculas que pudieran proponerse como biomarcadores de cáncer más específicos para este tipo de cáncer para ayudar a detectarlo en etapas pre-invasivas o tempranas. Aún más, existe la necesidad de encontrar marcadores pronósticos que ayuden a seleccionar las estrategias quimiopreventivas que puedan emplearse en el tratamiento temprano y más adecuado a cada paciente con CM.

El canal iónico HERG1 juega un papel importante en diferentes tipos de neoplasias, en las cuales se ha encontrado sobreexpresado y relacionado con el proceso de invasividad. Desde el punto de vista de la biología del cáncer humano es importante conocer como participa este canal en el CM dado que hasta el momento, no se ha realizado el estudio del canal iónico HERG1 en biopsias de CM humano. Por lo anterior, en este trabajo se propone el análisis en la expresión del transcrito y la proteína del canal iónico HERG1 (K<sub>v</sub>11.1, KCNH2) en muestras de CM de pacientes.

## **4. HIPÓTESIS**

---

**El transcrito y la proteína HERG1 presentan una sobreexpresión en tejidos de CM en comparación con tejido de mama normal.**

## **5. OBJETIVOS**

---

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

**Demostrar que existe una expresión diferencial del transcrito y la proteína HERG1 en tejido de CM comparado con la expresión de esta proteína en tejido de mama normal.**

## 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Determinar los niveles de expresión del transcrito HERG1 en tejido de CM y en tejido de mama normal.*
- *Identificar la proteína HERG1 en tejido de CM y en tejido de mama normal.*
- *Comparar los perfiles de expresión del transcrito HERG1B en tejidos de CM y tejidos de mama normal.*
- *Establecer el valor de HERG1 como marcador molecular de CM.*

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **6.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES**

#### **6.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Muestras incluídas en parafina con diagnóstico histopatológico de CM.

Muestras de mama transoperatorias con diagnóstico histopatológico de CM.

#### **6.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Muestras incluidas en parafina no diagnosticadas o con datos insuficientes.

Muestras incluidas transoperatorias no diagnosticadas o con datos insuficientes.

Muestras de CM de hombre.

#### **6.1.3. MUESTRAS DE CONTROL**

Muestras de tejido normal de mama de glándula postmortem.

### **6.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

Las muestras de CM incluídas en parafina y en fresco fueron diagnosticados por un experto en patología. Se comenzó a trabajar con los bloques de parafina para realizarles RT-PCR convencional pero la cantidad de RNA obtenido no fue óptimo para este método. Sin embargo, algunas de estas muestras pudieron analizarse por medio de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las muestras quirúrgicas que fueron tomadas durante el transoperatorio, se congelaron y transportaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas en un ultracongelador a -80 °C.

### **6.2.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS CLÍNICAS**

Las muestras de CM en fresco fueron obtenidas de pacientes que acudieron al servicio de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y fueron proporcionadas por el Dr. Diego Arenas Aranda del Laboratorio de Genética. Las muestras incluídas en parafina provinieron del Hospital Regional 1o. de Octubre del ISSSTE, del archivo del Departamento de Patología y fueron proporcionadas por el Dr. Fernando García Dolores. Las muestras de tejido de mama normal postmortem fueron obtenidas del SEMEFO proveídas por el Dr. Fernando García Dolores.

### **6.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

Todo el material usados tuvieron un pre-tratamiento con RNAsa AWAY (Ambion®) y se utilizó agua tratada con DEPC para eliminar la actividad de RNAsas. También, en todos los procedimientos, se utilizaron guantes de látex nuevos para evitar degradación y/o contaminación de las muestras. Para la extracción de RNA total se utilizó un kit de extracción de RNA para muestras incluídas en parafina (RecoverAll, Ambion®). Para las muestras de CM en fresco y de tejido normal de mama se utilizó el mismo kit a partir de la digestión con proteasa (Anexo 1).

### **6.4. RETROTRANSCRIPCIÓN (OBTENCIÓN DE cDNA)**

Tras la obtención del RNA total de las muestras de CM en fresco, incluídas en parafina y las muestras control, se obtuvo cDNA a través de retrotranscripción por medio de un kit comercial (Superscript II, Invitrogen®) (Anexo 2).



## **6.5. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA**

Por ser muy pequeña la cantidad de RNA aislada de las muestras de CM, para evaluar la calidad e integridad de las muestras, verificar que durante la toma de muestra y transporte no ocurrió degradación y que el proceso de extracción se efectuó de manera correcta, se realizó una RTPCR convencional de dos pasos, en la cual se amplificó el gen de  $\beta$ -actina humana, el cual es un gen constitutivo.

## **6.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RTPCRTR)**

La principal meta de la PCR en tiempo real es amplificar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos en una muestra, incluso cuando éstos se presentan en pequeñas cantidades <sup>134</sup>.

La PCR en tiempo real se caracteriza por evaluar el producto amplificado después de cada ciclo, mientras que con la PCR convencional la detección del producto amplificado se realiza al final de la reacción<sup>135</sup>. El sistema de la PCR cuantitativa en tiempo real está basado en la detección y cuantificación de un fluoróforo que tiene la función de reportero. La señal de fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la cantidad del producto de la PCR y el sistema es capaz de detectar el incremento de la fluorescencia en cada uno de los ciclos, lo cual hace posible vigilar la reacción durante todo el proceso de amplificación, donde al final la señal detectada está relacionada con la cantidad de templado inicial. El Ct es un límite determinado al identificar el ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se levanta sobre el ruido de fondo. En PCR en tiempo real es importante el Ct (Threshold cycle). Este Ct es obtenido por el programa del equipo de tiempo real usado (fqdpcr versión 4.0 Bioer Technology), pero puede ser modificado por el operario. El Ct aparece en la fase exponencial de la reacción de

PCR y es inversamente proporcional al número de copias blanco. Por lo tanto, mientras más grande es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia y son más bajos los valores de Ct.

Existen varios sistemas de PCR en tiempo real que permiten evaluar la fluorescencia cuando se amplifica el DNA <sup>136</sup> entre los cuales los más comunes son: uso de agentes intercalantes en la doble cadena de DNA, pruebas basadas en la hibridación y pruebas de hidrólisis.

En este estudio se utilizaron agentes intercalantes, los cuales son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a el DNA de doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR Green, el cual aumenta en más de 1000 veces su fluorescencia cuando se une al surco menor del DNA<sup>136</sup>. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El SYBR Green presenta un pico de absorción en una longitud de onda de 480nm y un pico de emisión en 520 nm<sup>141</sup> (Fig. 15).

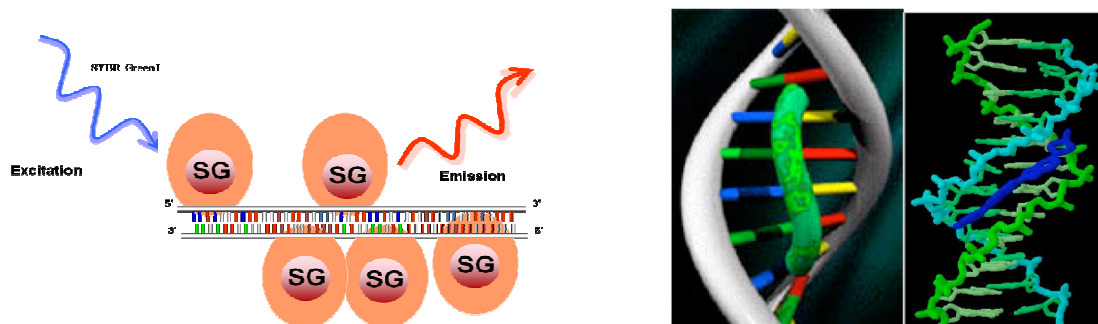


Fig.15. Representación de la interacción de SYBR Green con el DNA de doble cadena.

## 6.7. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN DE INTERES Y EL GEN CONSTITUTIVO

Para esto se estandarizaron las condiciones para amplificar el gen de *β-actina humana* y *HERG1B* que fue nuestro gen de interés, para lo cual se utilizaron los siguientes oligonucleótidos.

*β-actina humana* F 5'- CAACTCCATCATGAAGTGTGAC-3'

*β-actina humana* R 5'- GCCATGCCAATCTCATCTTG-3'

*HERG1B* F 5' -CGATTCCAGCCGGGAAGGC- 3'

*HERG1B* R 5'-TGATGTCCACGATGAGGTCC- 3' <sup>131</sup>

Para mayores detalles, ver anexo 3.

## 6.8. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para realizar la detección de la proteína HERG1, se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (Anti-HERG APC-109; Alomone, Israel), el cual reconoce el epítipo: AFLLKETEEGPPATEC, que corresponde a los residuos 430-445, exón 6 (No. de acceso: Q12809) .

## 6.9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la estrategia experimental que seguimos para realizar este trabajo (Fig. 16).

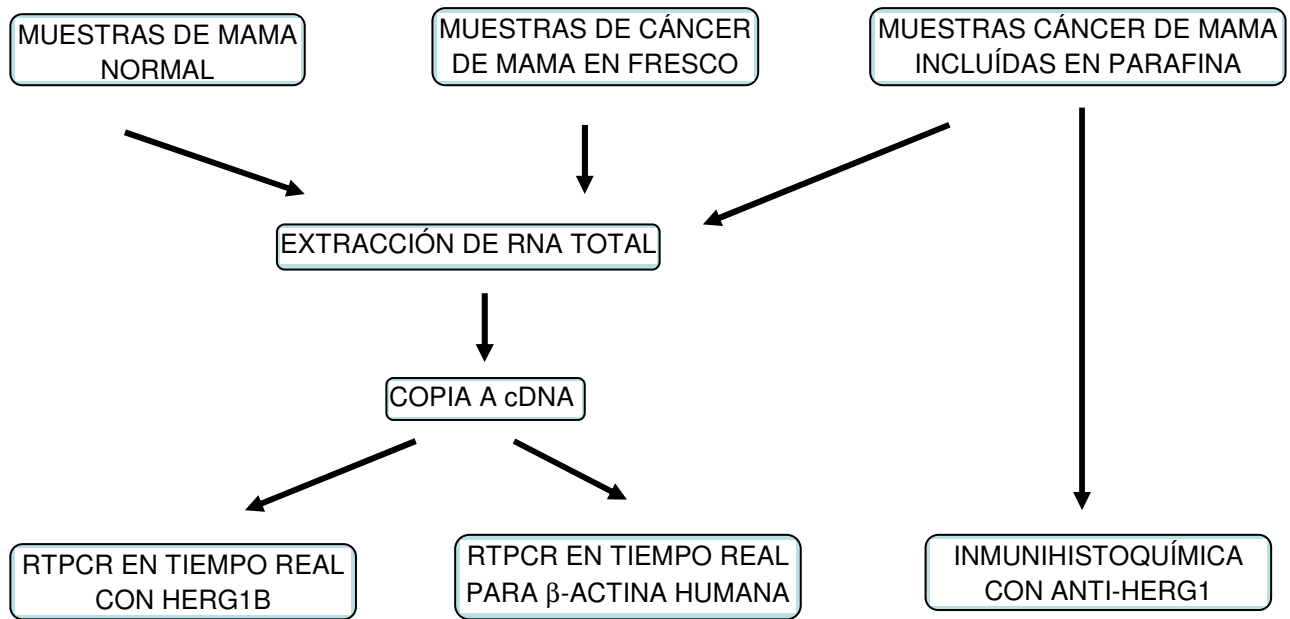


Fig. 16. Diseño experimental.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. MUESTRAS CLÍNICAS

- Las muestras de CM y de tejidos de mama normal se obtuvieron con la colaboración del Dr. Diego Arenas Aranda del Laboratorio de Genética del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y el Dr. Fernando García Dolores del Departamento de Patología del Hospital Regional 1o. de Octubre del ISSSTE. Se obtuvieron en total 39 muestras con diagnóstico histopatológico de CM.

### 7.2. NORTHERN ELECTRÓNICO DE HERG1

- Se realizó la búsqueda de la expresión en diferentes tejidos sanos de HERG1 en la base de datos del NCBI<sup>144</sup>, en donde se puede observar que hay tejidos donde el gen *HERG1* se expresa abundantemente como astrocitos y glándula pituitaria (hipófisis). En otros tejidos y órganos como: ojo, corazón, tejido nervioso periférico y páncreas tienen un nivel de expresión intermedio, mientras que en glándula mamaria sana no hay transcritos de este gen reportados (Fig. 17).

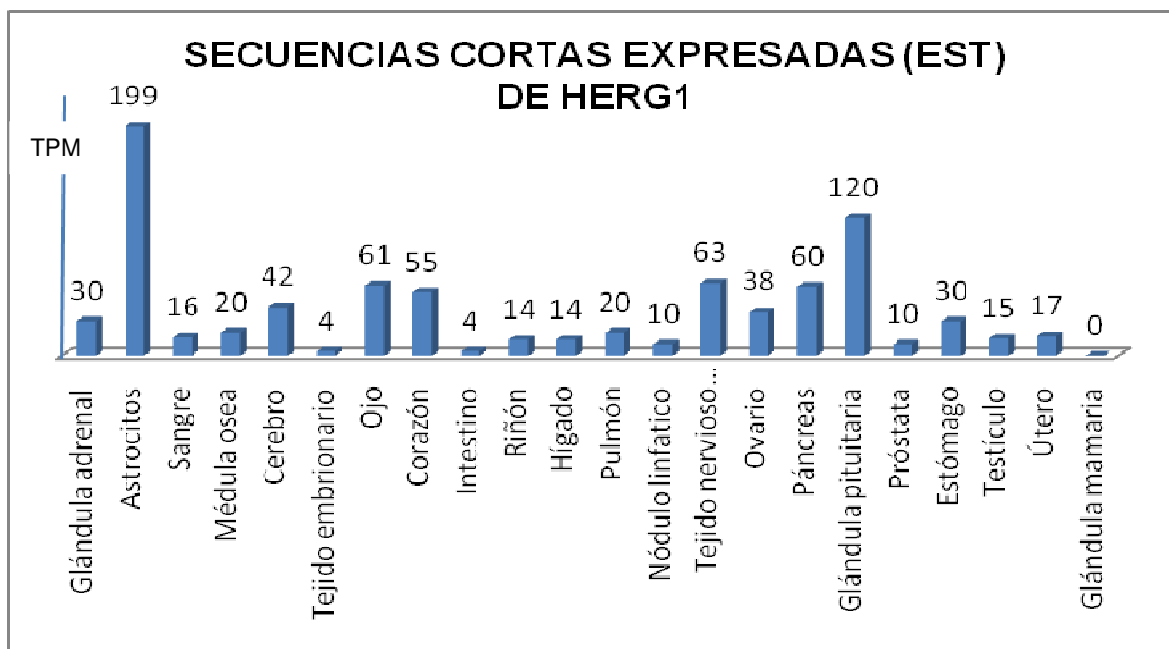


Fig. 17. Northern electrónico de EST de HERG1 en tejidos y órganos sanos, la cantidad expresada es en TPM (transcritos por millon).

- Asimismo, se revisó el perfil de expresión de *HERG1* en tejidos neoplásicos diferentes en la misma base de datos del NCBI<sup>144</sup>. En este caso, se puede observar que hay tejidos tumorales con alta expresión de *HERG1* como: tumor neuroectodermico primitivo, tumor pancreático, tumor gastrointestinal y de glioma. Con respecto a CM, no existen reportes de la expresión de este gen en la base de datos analizada (Fig. 18).

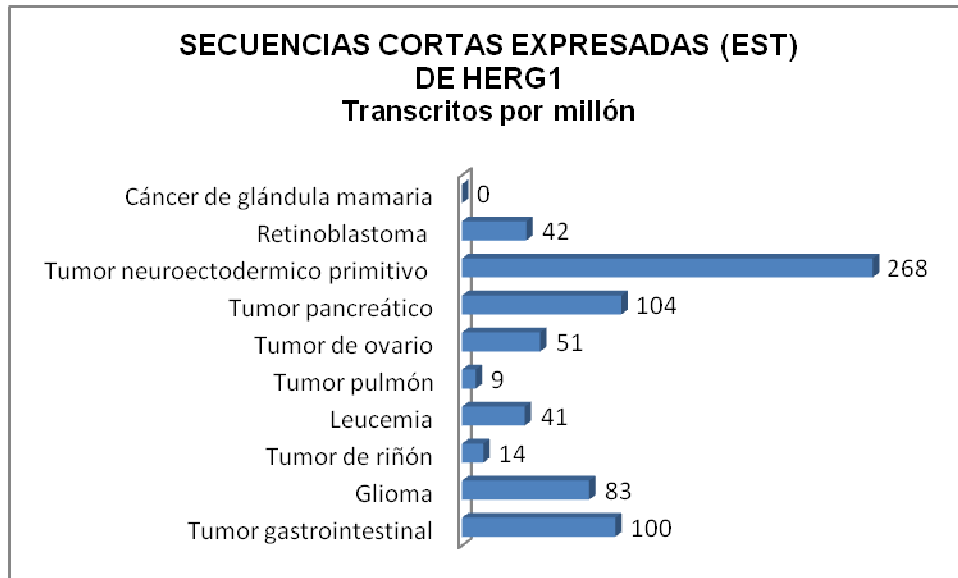


Fig. 18. Northern electrónico de EST en diferentes tipos de cáncer.

### 7.3. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN CONSTITUTIVO COMO CONTROL INTERNO

- Una vez obtenido el cDNA de las 39 muestras de CM y las de tejido mamario normal, procedimos a estandarizar la amplificación del gen de  $\beta$ - actina humana mediante PCR en tiempo real (PCRTR) por SYBR Green. Este gen es constitutivo en todos los tejidos y se utiliza como control interno para normalizar los niveles de expresión del gen de interés y corroborar que el cDNA no presentara degradación. Este procedimiento sirvió para garantizar que el proceso de extracción se hubiera efectuado adecuadamente, como se mencionó en la metodología.

## 7.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN *HERG1*

- Después de haber estandarizado la amplificación del gen constitutivo, se procedió a establecer las condiciones para la extensión, por PCRTR, del gen *HERG1* y de su isoforma *HERG1B*. En las muestras de CM sólo fue posible observar la amplificación de la isoforma *HERG1B*, mientras que no hubo amplificación de la isoforma completa de *HERG1*. Se muestra el programa de estandarización para realizar la RTPCR en tiempo real (Fig. 19).

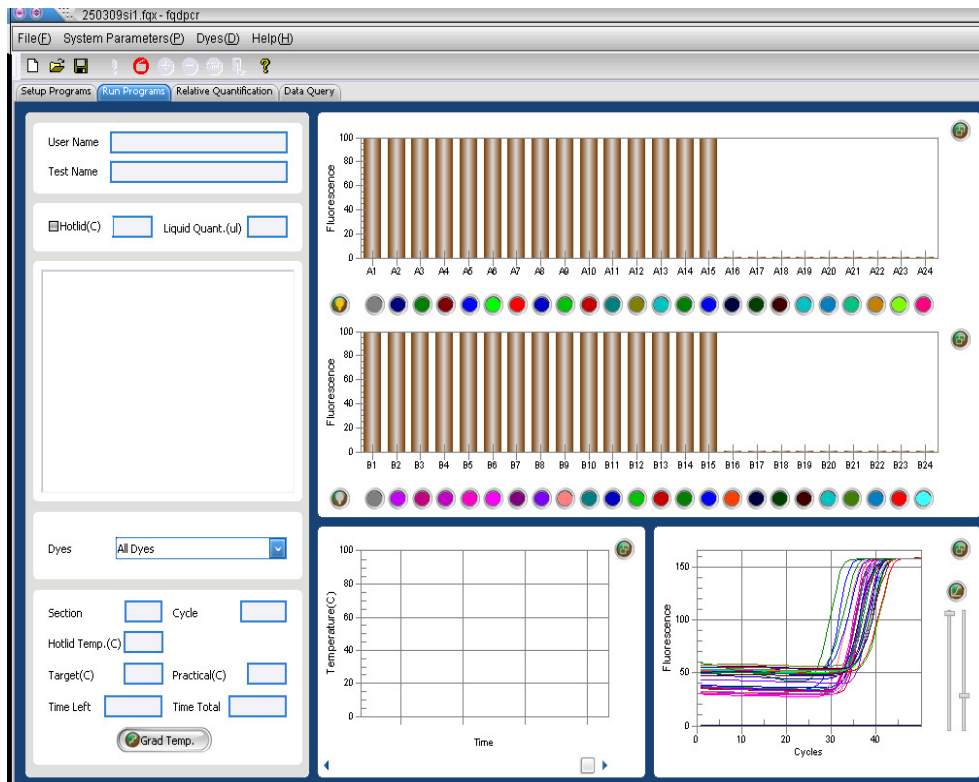
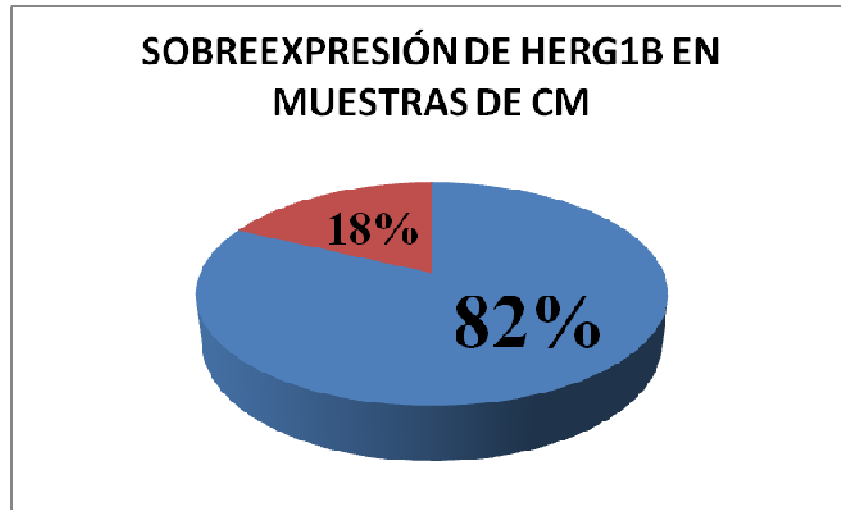


Fig. 19. Detección de  $\beta$ -actina humana y *HERG1B* en las muestras de CM mediante PCR en tiempo real.

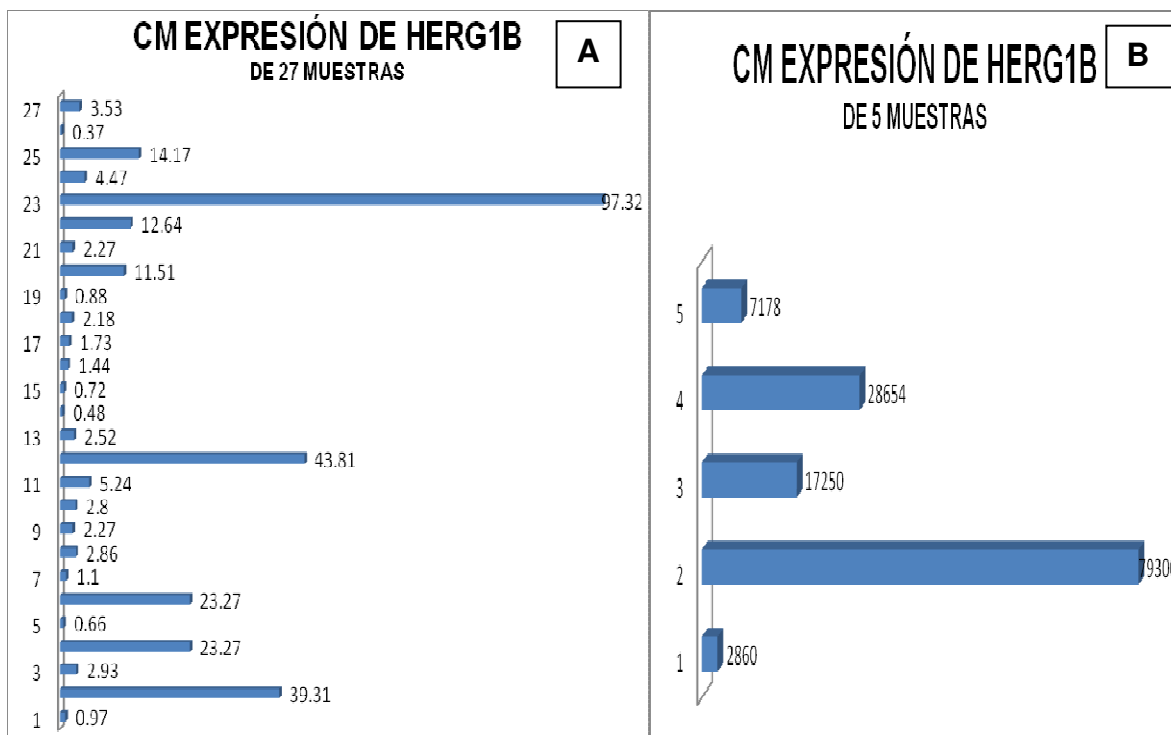
- De las 39 muestras de CM estudiadas, todas amplificaron el gen constitutivo  $\beta$ -actina humana. 32 muestras (82%) fueron positivas para la amplificación de *HERG1B* y 7 muestras (18%) fueron negativas (Fig. 20).



**Fig. 20. Proporción de expresión de la isoforma *HERG1B* en CM. 82% de las muestras de CM fueron positivas, mientras que el 18% fueron negativas.**

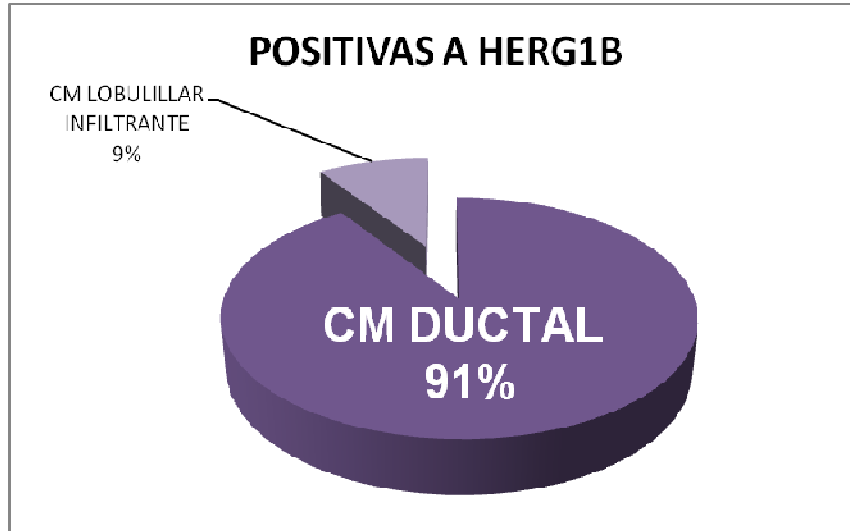


- El software fdq (BIOER) obtiene valores de fluorescencia relativa que se pueden comparar entre sí al transformar los datos de la fluorescencia emitida por los productos amplificados con los oligonucleótidos para *HERG1B* y  $\beta$ - actina humana de las muestras de CM y del tejido normal, los cuales son adquiridos por el sistema óptico del termociclador de tiempo real. A partir de estos datos se puede observar que las 32 muestras de CM con sobreexpresión de *HERG1B*, presentan dos tendencias principales: una de expresión baja a moderada (Fig. 21A) y otra de expresión alta a muy alta (Fig. 21B). Las barras muestran los niveles de expresión relativa de las muestras tumorales contra los tejidos normales (T/N).



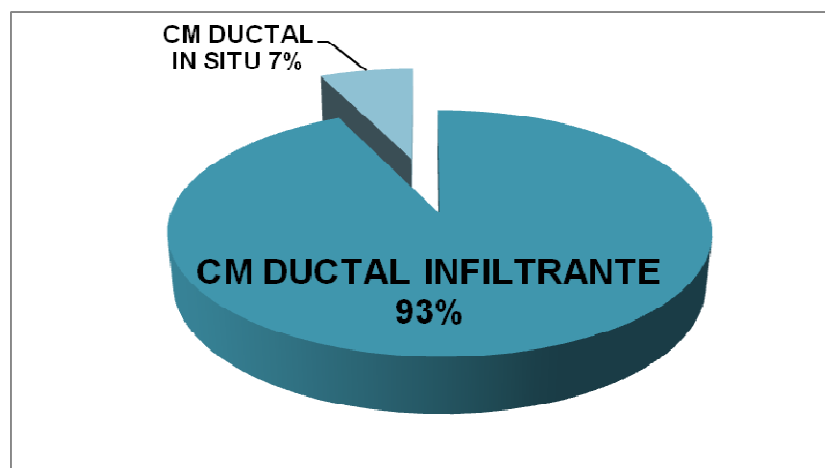
**Fig 21. Gráfica con los niveles de sobreexpresión en PCR en tiempo real de *HERG1B* como T/N. A, Muestras con expresión baja a moderada. B, Muestras con niveles de expresión alta a muy alta.**

- De las 32 muestras con sobreexpresión de *HERG1B* por PCRTR, 29 (91%) muestras tuvieron el diagnóstico histopatológico de CM Ductal, mientras que 3 (9%) correspondieron a CM lobulillar infiltrante (Fig. 22).



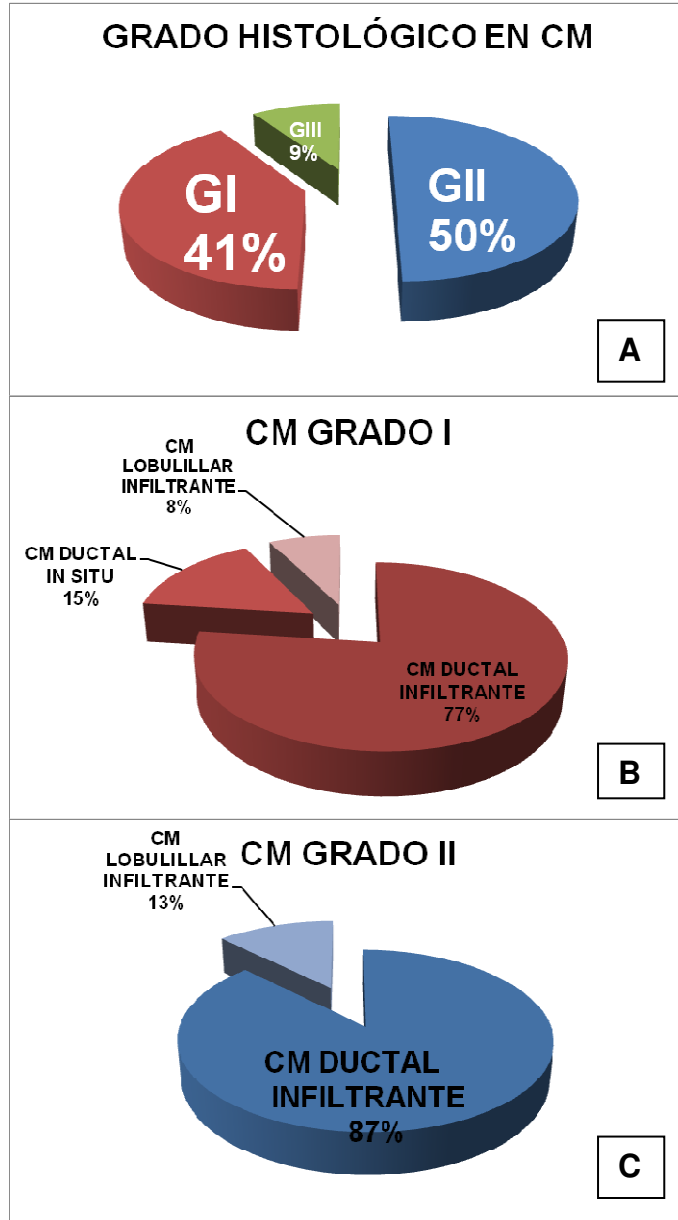
**Fig. 22. Distribución de las muestras con sobreexpresión de *HERG1B* por PCR en tiempo real de acuerdo al diagnóstico histopatológico.**

- De las 29 muestras con sobreexpresión de *HERG1B* por PCRTR, con diagnóstico histopatológico de CM Ductal, 2 (7%) son de tipo *In Situ* y 27 (93%) son de tipo infiltrante (Fig. 23).



**Fig. 23. Tipo de CM ductal con sobreexpresión de *HERG1B*.**

- Las muestras positivas a *HERG1B*, de acuerdo al grado histológico de CM fueron: Grado I: 13 muestras (41%), Grado II: 16 muestras (50%) y Grado III: 3 muestras (9%) (Fig. 24A).

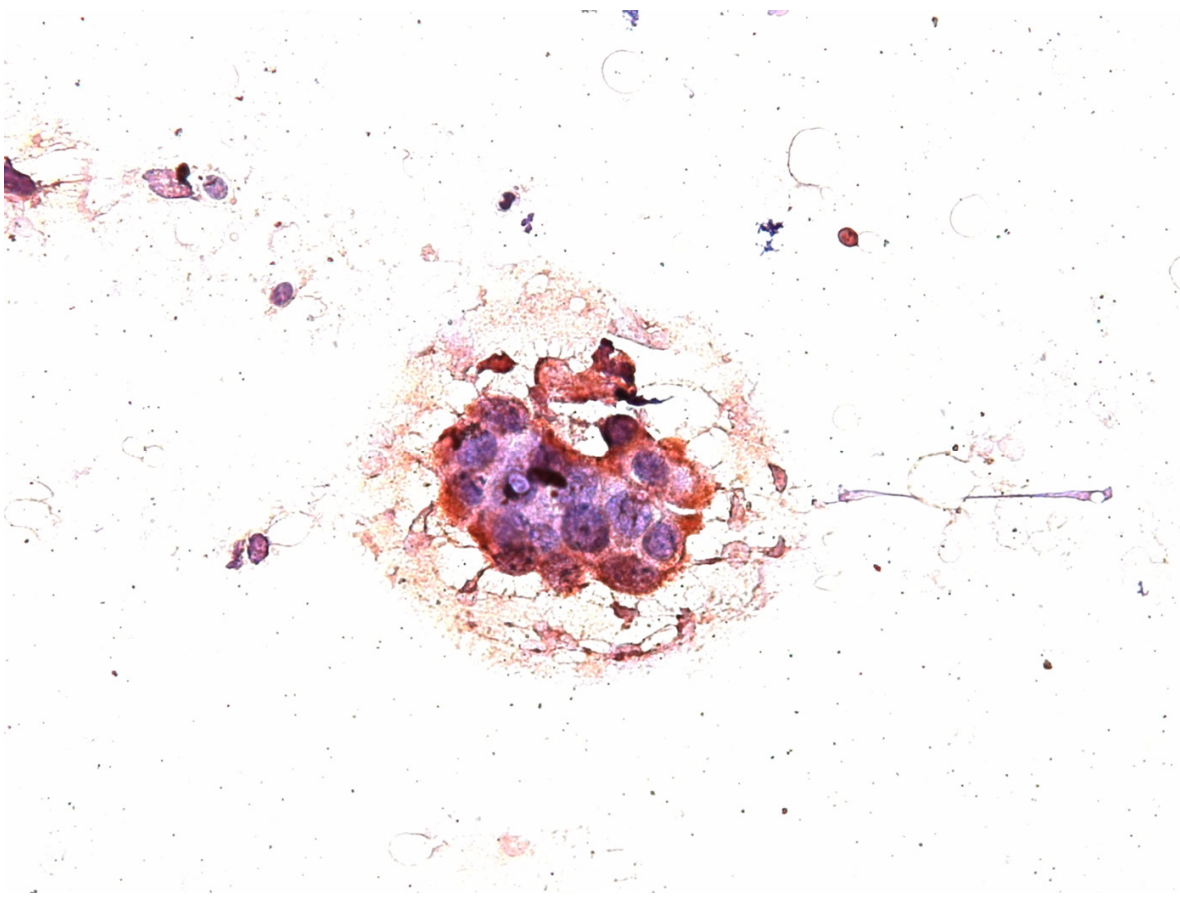


**Fig. 24. Distribución de las muestras de CM con sobreexpresión de *HERG1B* por PCR en tiempo real. A, Grado histológicos der todas las muestras con sobreexpresión de *HERG1B*. B, Tipo de CM de las muestras con sobreexpresión con Grado I. C, Tipo de CM de las muestras con sobreexpresión con Grado II.**

- De las 13 muestras con grado histológico I, 2 (15%) tuvieron el diagnóstico histopatológico de CM ductal *In Situ*, 10 (77%) muestras tuvieron CM ductal infiltrante, y hubo 1 (8%) con CM lobulillar infiltrante (Fig. 24B).
- De las 16 muestras de CM con Grado II, 14 (87%) tuvieron diagnóstico histopatológico de cáncer ductal infiltrante y 2 (13%) presentaron diagnóstico histopatológico de cancer lobulillar infiltrante (Fig. 24C).
- De las 3 muestras con Grado III, el 100% tuvieron el diagnóstico histopatológico de CM ductal infiltrante.

## 7.5. INMUNOHISTOQUÍMICA DEL CANAL HERG1

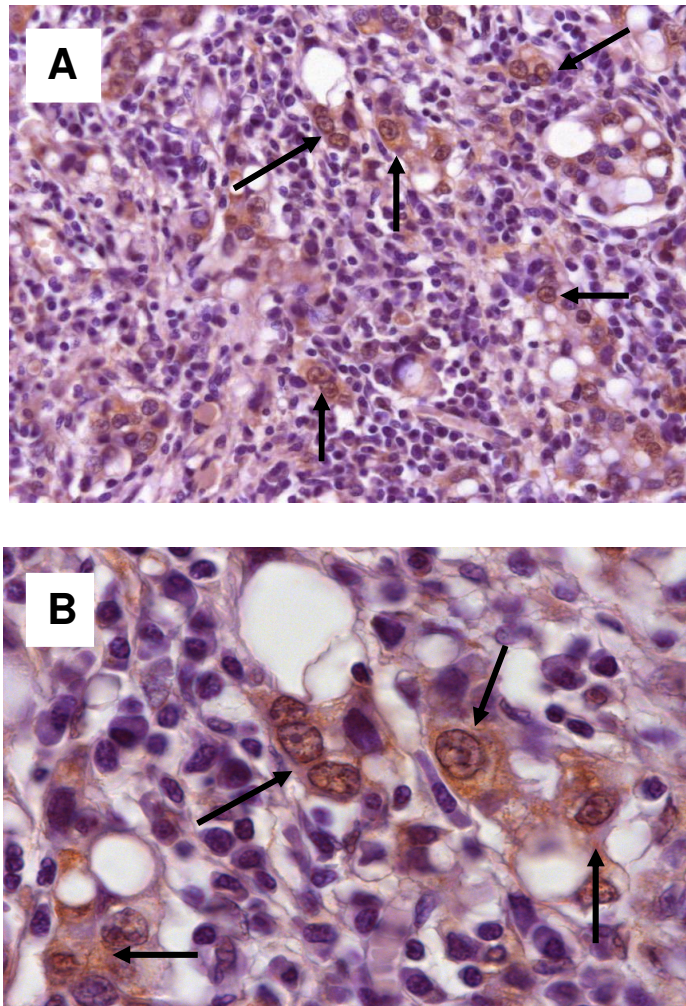
- La inmunohistoquímica se realizó en todas las muestras, se tomaron las imágenes mas representativas.
- El extendido citológico muestra positividad con el anticuerpo policlonal comercial (Alomone, Isarael) Anti-HERG1 en células ductales de un carcinoma de glándula mamaria (color café) Fig. 25.



**Fig. 25. Inmunohistoquímica para la proteína HERG1. Impronta de CM todo el conglomerado de células tumorales muestra la sobreexpresión de la proteína HERG1 (color café).**

**Aumento de 40X.**

- La imagen siguiente tiene metástasis de carcinoma de mama ductal de glándula mamaria en un ganglio linfático incluida en parafina. Se observan células con señal positiva para la proteína HERG1 (color café) algunas de ellas en hileras y otras formando ductos. Cabe señalar que las células con morfología normal (los linfocitos de la imagen y las células de los conductos normales de la glándula mamaria) fueron negativos para la reacción de inmunohistoquímica (color morado por la contratinción con Hematoxilina-eosina), por lo anterior la misma laminilla funciona como control negativo con las células normales presentes (Fig. 26 A y B) (Anexo 4).



**Fig. 26. Inmunohistoquímica para la proteína HERG1. Las flechas señalan las señales con sobreexpresión de la proteína HERG1 (color café), las células normales negativas a HERG1B están en color morado. A, Aumento de 40X. B, Aumento de 100X.**

- Morfológicamente, las células epiteliales son difíciles de identificar cuando se encuentran de manera aislada, por esta razón, la tinción con inmunohistoquímica obtenida para HERG1 podría ser considerada como un marcador molecular para detectar micrometástasis en ganglios linfáticos.

## 8. DISCUSIÓN

---

Como ya se ha expuesto anteriormente, el CM es una enfermedad maligna cuya progresión natural lleva a la muerte. En México cada vez van aumentando los casos de CM convirtiéndose en un problema de salud prioritario ya que es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres.

Diversos canales de potasio han sido reportados como marcadores moleculares de cáncer, ya que presentan una expresión diferencial en tejidos neoplásicos en comparación con tejidos normales. Entre los canales con sobreexpresión en cáncer de mama podemos mencionar al Kv1.3<sup>142</sup>, así como el KCNK9, que se encontró sobreexpresado en cáncer de mama entre 5 a 100 veces más en 28 de 64 muestras<sup>143</sup>. Otro canal es el EAG (KCNH1), el cual se ha encontrado sobreexpresado en líneas de cáncer de mama como MCF-7, EFM-19 y BT-474, y se ha observado que confiere propiedades oncogénicas como proliferación incrementada, pérdida de la inhibición al contacto e independencia al sustrato. Asimismo, es un potencial marcador temprano para diagnóstico<sup>144,145</sup>. El canal HERG1 (KCNH2) se ha encontrado sobreexpresado en la línea celular de carcinoma de mama humano SkBr3<sup>131</sup> y MCF-7<sup>146</sup> (chen sz 2005) aunque no se ha reportado en cáncer de mama sólido.

En nuestro estudio, empezamos a trabajar con muestras de CM incluidas en parafina, a las cuales se les realizó RT-PCR convencional. Sin embargo, con esta estrategia no se pudo observar amplificación en la mayoría de las muestras, aún con múltiples modificaciones a las condiciones de amplificación. Posteriormente, fue posible utilizar PCR cuantitativa en tiempo real, técnica de amplificación más sensible que la convencional, además, fue posible obtener muestras en fresco de CM. Con la RTPCR cuantitativa fue posible obtener señales de amplificación positivas con las muestras de CM incluidas en parafina, así como con las muestras de CM en fresco. Se pudo observar que la expresión del gen en muestras de CM estaba sobreexpresada en comparación con el tejido de mama



normal, que se obtuvo de varias muestras diferentes postmortem, ya que las muestras de mama adyacentes al tumor mostraban una expresión menor a las de CM, pero no significativamente diferente, esto concuerda con lo observado por Hemmerlein 2006<sup>147</sup>, quien hizo un estudio de la expresión del gen del canal iónico EAG (KCNH1) en diferentes neoplasias obtenidas de pacientes como: mama, próstata, hígado, colon, pulmón, cervicouterino, gástrico pancreático y renal, este canal ha sido reportado con anterioridad como un marcador molecular de cáncer temprano en particular en el CaCU<sup>148</sup>. Es también un canal de K<sup>+</sup> dependiente de voltaje, en el artículo de Hemmerlein encuentran el mismo fenómeno detectado en esta tesis, que tejido adyacente a CM, supuestamente normal, se detecta expresión del canal mayor al tejido normal obtenido de una mujer sin CM.

Así, por RTPCR cuantitativa encontramos la sobreexpresión del gen *HERG* (KCNH2) en su isoforma *1B*, en 82% (32) de un total de 39 muestras de pacientes con CM (23 incluidas en parafina y 16 en fresco). La expresión del gen en su isoforma original *HERG1* no fue detectada en ninguna muestra. Este hallazgo es interesante, ya que la isoforma *HERG1B* ha sido reportada sólo en dos tejidos normales que son cerebro y corazón, a nivel tumoral en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular de leucemia monoblástica humana FLG 29.1, así como en muestras de leucemia mieloide aguda expresándose junto con *HERG1*<sup>131,149</sup>. En este último caso, Crociani en 2003 reporta que *HERG1* y *HERG1b* se expresan de manera dependiente del ciclo celular y Pillozi en 2007 describe su asociación con migración celular e invasión en ratones inmunodeficientes y con el fenómeno de recaída y periodos más cortos de supervivencia en pacientes. En las muestras de CM, se encontró únicamente el transcrito de *HERG1B*, lo cual sólo ha sido reportado en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda, donde se encontró que sólo el transcrito de *HERG1B* estaba sobreexpresado en 80% de los casos y que el nivel de expresión correlacionaba con la presencia de factores pronóstico favorables en el diagnóstico, por lo cual *HERG1B* puede ser un marcador pronóstico de supervivencia de pacientes con LLA<sup>150</sup>. Por otro lado cabe mencionar que la proporción de casos

HERG1B positivos de 82% es interesante, si tomamos en cuenta que la frecuencia de casos positivos del marcador pronóstico ERBB2, altamente usado en la clínica es de hasta 30%. A este respecto, podemos mencionar que HERG1 se ha mostrado como un posible marcador tanto diagnóstico como pronóstico de diversas neoplasias. En cuanto a tumores en el cerebro, Masi en 2005 encontró que en el glioblastoma multiforme, un tipo de tumor en el cerebro que se asocia con invasión y mal pronóstico, *HERG1* se expresaba hasta en un 75%<sup>151</sup>. En 2009, Dolderer encontró la expresión del transcrito de HERG1 en todas las muestras de cáncer de colon (100%), independientemente de su etapa, por lo cual sugiere que este gen puede ser un marcador de este tipo de cáncer<sup>152</sup>. Asimismo, Ding en 2008 encuentra la sobreexpresión de HERG1 en muestras de pacientes con carcinoma epidermoide de esófago hasta en 81.8%, además encuentra que los pacientes HERG1 positivos presentaron un tiempo de supervivencia postoperatorio significativamente más corto que los HERG1 negativos (30 vs. 56 meses) y lo proponen como un factor pronóstico de supervivencia<sup>153</sup>. Igualmente, el mismo autor en 2009 encontró la expresión de este gen en carcinoma gástrico en 73% de las muestras y observó que esta expresión se asocia con etapas avanzadas de los tumores y con la metástasis a nódulos linfáticos, proponiendo a este gen como marcador potencial de invasión y de supervivencia en cáncer gástrico<sup>154</sup>.

Con respecto al gran rango de expresión encontrado en las muestras de CM en este estudio, (0.88 hasta 79300), encontramos que es un fenómeno también observado en la expresión de este gen en leucemia mieloide aguda, donde se registran niveles de 0.35 hasta 562000 y se encuentra que los niveles de expresión se asocian a la migración celular<sup>149</sup>. Por otro lado, en este artículo y en el de Masi 2005, se observa que este gen interviene en la migración celular por la activación de FLT-1<sup>149</sup> y que contribuye a la malignidad al estimular la neoangiogénesis al promover la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), por lo cual lo proponen como un marcador de progresión tumoral<sup>151</sup>.

Asimismo, si comparamos los resultados obtenidos en nuestro estudio (82% de muestras de CM positivas a la presencia del transcrito *HERG1B*, éstos son comparables a la proporción de casos positivos para la expresión de otros canales iónicos en otras neoplasias. Por ejemplo, la expresión de TRPM8 en cáncer de próstata con PCR en tiempo real se reportó en 64% de los casos<sup>15</sup>. El gen *KCNK9* se encontró sobreexpresado de 5-100 veces más en 44% de los casos de CM estudiados y en 35% de los casos de cáncer de pulmón<sup>143</sup>. Por otro lado, el canal TRPV6 se ha encontrado sobreexpresado en CM en 66% de las muestras<sup>155</sup> y en 67% de las de cáncer de próstata<sup>156</sup>.

En la inmunohistoquímica, fue posible observar una señal para el canal HERG1 en color marrón en células que muestran ya morfología diferente a la normal, mientras que las células con morfología y apariencia normales no mostraron la señal positiva, constituyéndose como el control negativo en la misma laminilla.

## 9. CONCLUSIONES

---

En las muestras de CM sólo fue posible observar la amplificación de la isoforma *HERG1B*, mientras que no hubo amplificación de la isoforma completa de *HERG1*.

El RNAm de *HERG1B* se sobreexpresa en tejido de CM en comparación con tejido de mama normal.

Existe sobreexpresión de la proteína *HERG1B* en CM.

La frecuencia de expresión positiva a *HERG1B* en muestras de CM fue de 82%.

La frecuencia de expresión de las muestras positivas a *HERG1B* de CM de acuerdo a su diagnóstico histopatológico fue de 9% de CM lobulillar infiltrante y 91% CM ductal el cual a su vez se subdivide en 93% de CM ductal infiltrante y 7% de CM ductal *In situ*. De acuerdo a su grado histológico fue GI:41% el cual se subdivide en 77% de CM ductal infiltrante, 15% CM ductal *In situ* y 8% CM lobulillar infiltrante. GII:50% el cual se subdivide en 87% CM ductal infiltrante y 13% CM lobulillar infiltrante. GIII: 9% siendo 100% de CM ductal infiltrante.

Es indudable que la expresión de *HERG1B* está afectada en el CM por lo que se debe de estudiar a fondo para determinar de qué manera afecta el proceso de carcinogénesis. Este trabajo es innovador ya que este gen aún no se ha reportado en CM.

En la inmunohistoquímica se encontró positiva para la proteína del gen *HERG1B*.

*HERG1B* puede ser un marcador temprano, pero falta comprobarlo con más muestras de CM *In Situ* y/o grado I.

Se concluye que el gen *HERG1B* es un marcador tumoral diagnóstico en CM.

## 10. PERSPECTIVAS

---

Aun faltarían experimentos por realizar (hibridación *In Situ*, inhibir la expresión de *HERG1B* en varias líneas celulares de CM y observar si hay una disminución en la proliferación, como se ha hecho con el canal iónico EAG<sup>147</sup>), sin embargo con los experimentos realizados hasta el momento pueden sugerir que sería un gran marcador molecular diagnóstico en CM.

Realizar en muestras negativas, amplificación de ERBB2, RE y RP.

También es necesario evaluar este canal como marcador molecular temprano para ayudar a diagnosticar en fases más tempranas de CM y de pronóstico, probablemente en un futuro no muy lejano desarrollar nuevas terapias.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

---

1. World Health Organization. Cancer. Fact sheet No. 297. February 2009.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
3. Stevens A. *Patology the Stevens*. Ed. Mosby. 2004:34-7.
4. Kasper Dennis L., Braunwald Eugene, Hauser Stephen, Longo Dan, Larry Jameson, Fauci Anthony. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Professional. 2004.
5. Orozco Orozco Esther, Gariglio Vidal Patricio. *Genética y Biomedicina molecular*. Ed.Limusa. 2000; 182-4.
6. Aceves EA. *Boletín trimestral del Johnson & Johnson Medical México*, 2003; 3:7.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2007. Last accessed July 24.
8. Amrikachi M, Green LK, Rone R, Ramzy I. Gynecomastia: citologic feactures and diagnostic pitfalls in fine needle aspirates. *Acata Cytol*. 2001; 45(6): 948-52.
9. Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A. Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol*. 1993; 122:1131-43.
10. Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp*. 2005; 266: 225-32.
11. Barclay L. More evidence linking estrogen plus progestin therapy to breast cancer. *JAMA*. 2003; 289:3243-53.
12. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K et al. Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer. *JAMA*. 1993; 269: 1970-4.
13. Binggeli R, Weinstein RC. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol*. 1986. 123:377-401.

14. Blackwood MA, Weber BL. BRCA1 and BRCA2 from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 1969-77.
15. Börner T, Dürst M, Kemmner Wolfgang. Identification and Characterization of the Ion Channel TRPM8 in Prostate Cancer. 30.12.2003.
16. Breast. In: American Joint Committee on Cancer; AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002:171-180.
17. Brinton LA, Daling JR, Liff JM et al. Oral contraceptives and breast cancer risk among younger women. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87: 827-35.
18. Brück Patrick, Vilches Cisneros Natalia, Ramos López Elizabeth, Barboza Quintana Oralia, Ancer Rodríguez Jesús, Flores Gutiérrez Juan Pablo. Expresión del Her2-Neu en el adenoma ductal de la glándula mamaria: correlación con parámetros histopatológicos y expresión de receptores estrogénicos en pacientes mexicanas. *Ginecol Obstet Mex*. 2006; 74: 516-22.
19. Parker SL, Tong T, Bolden S et al. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 1997; 47: 5-27
20. Slattery ML, Sweeney C, Edwards S, Herrick J, Baumgartner K, Wolff R. Body size, weight change, fat distribution and breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 102: 85-101.
21. Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Méx* 2009; 51(2): 208-19.
22. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) 2001. Compendio de cáncer. Morbilidad / Mortalidad. Secretaría de Salud. Dir. Gral. de Epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>.
23. Lozano R, Knaul FM, Gómez-Dantés H, Arreola-Ornelas H, Méndez O. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud. 2008.
24. Secretaría de Salud Jalisco. Dirección General de Planeación. Información Relevante de Salud. 2006. [http://ssj.jalisco.gob.mx/pdf/I\\_09CostaNte.pdf](http://ssj.jalisco.gob.mx/pdf/I_09CostaNte.pdf).
25. Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. Boletín Informativo No. 35. 2007. <http://ssj.jalisco.gob.mx/boletines/boletines07/mayo02.html>.

26. Ferlay J, Bray P, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No.5, Version 2.0. Lyon: IARC Press. 2004.
27. Lazcano- Ponce E. Nuevas alternativas de prevención secundaria del cáncer cérvicouterino. Salud Pública de México. 2007. 49:32-34. Edición especial: VII Congreso de Investigación en Salud Pública.
28. Rodríguez-Cuevas S, Macías CG, Franceschi D, Labastida S. Breast Carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. Cancer. 2001; 91: 863-68.
29. López-Ríos O, Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Hernández-Avila M. La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica? Salud Pública Méx. 1997; 39: 259-65.
30. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW. Changing trends: An overview of breast cancer incidence and mortality. Cancer. 1994; 74: 222-27.
31. Key TJ, Verkasato PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. The Lancet Oncology. 2001; 2: 1-18.
32. Fiorica J. Prevention and treatment of breast cancer. Obst and Gyn Clin. 2001; 28: 711-26.
33. MacMahon B, Pugh TF. Principios y métodos de Epidemiología. La Prensa Médica Mexicana S.A. de C.V. México. 2ª edición en español 1988. Estudios de cohortes.
34. Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. Genomic basis for breast cancer: advances in personalized medicine. Salud Publica Mex. 2009; 51: 197-207.
35. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. Epidemiol Rev. 1993; 15: 36-47
36. Sattin RW, Rubin GL, Webster LA, Huzo CM, Wingo PA, Ory HW et al. Family history and the risk of breast cancer. JAMA. 1985; 253: 1908-13.
37. Brinton LA, Daling JR, Liff JM et al. Oral contraceptives and breast cancer risk among younger women. J Natl Cancer Inst. 1995; 87: 827-35.
38. Barclay L. More evidence linking estrogen plus progestin therapy to breast cancer. JAMA. 2003; 289: 3243-53, 3254-63, 3304-06.
39. Roy JA, Sawka CA, Pritchard KI. Hormone replacement therapy in women with breast cancer. Do the risks outweigh the benefits? J Clin Oncol. 1996; 14: 997-1006.
40. Stoll BA. Obesity and breast cancer. Int J Obesity. 1996; 20: 389-92.



41. Wynder EL, Cohen LA, Muscat JE et al. Breast cancer: Weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 766-775
42. Ziegler RG, Hoover RN, Nomura AMY et al. Relative weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88: 650-60.
43. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1972; 48: 605-13.
44. Romero Figueroa MS, Santillán Arreygue L, Olvera Hernández PC, Morales Sánchez MA, Ramírez Mendiola VL. Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex.* 2008; 76: 667-672.
45. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 109-18.
46. Humphrey LL, Chan BKS, Deglefsen S, Helfand M. Screening for breast cancer. Systematic Evidence Review 15. Disponible en <http://www.ahrq.gov/clinic/serfiles.htm>
47. Ortega-Altamirano D, López-Carillo L, López- Cervantes M. Estrategias para la enseñanza del autoexamen del seno a mujeres en edad reproductiva. *Salud Publica Mex.* 2000; 42: 17-25.
48. Barth RJ Jr, Gibson GR, Carney PA, Mott LA, Becher RD, Poplack SP. Detection of breast cancer on screening mammography allows patients to be treated with less-toxic therapy. *AJR Am J Roentgenol.* 2005; 184: 324-29.
49. Cady B. How to prevent invasive breast cancer: detect and excise duct carcinoma *in situ*. *J Surg Oncol.* 1998; 69: 60-62.
50. Humphrey LL, Helfand M, Chan BKS. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 347-60.
51. Law J, Faulker K. Concerning the relationship between benefit and radiation risk, and cancers detected and induced, in a breast screening programme. *Br J Radiol.* 2002; 75: 678-84.
52. Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast U. S. and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27 825 patient evaluations. *Radiology.* 2002; 225: 165-75.

53. Elmore JG, Barton MB, Mocceri VM. Ten-year risk of false positive screening mammograms and clinical breast examinations. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1089-96.
54. Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Labastida-Almendaro S. First Breast Cancer Mammography Screening Program in Mexico: Initial Results 2005-2006. *Breast J.* 2009; 17.
55. Fonseca R, Hartmann LC, Petersen IA et al. Ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Ann Intern Med* 1997; 17 (11): 1013-22.
56. Kriege M, Brekelmans CTM, Boetes C, Besnard PE, Zonderland HM, Obdeijn IM. Efficacy of MRI and Mammography for Breast Cancer Screening in Women with a Familial or Genetic Predisposition. *N Engl J Med.* 2004; 29: 351-427.
57. Vargas-Ocampo G, Pérez-Reyes M, Mendoza-Gutiérrez M. Correlación diagnóstica con ultrasonido y resonancia magnética en la detección de cáncer de mama en estudios de mastografía, categorías III, IV y V de la clasificación ACR-BIRADS. *Rev Sanid Milit Mex.* 2005; 59(5).
58. Escobar SA, Villaseñor NY. Experiencias de un año en biopsias de mama realizadas por Ultrasonido y Estereotaxia comparadas con un resultado histológico. *INCan. Anal Radiol.* 2006; 1: 39-45.
59. Simpson JF, Gray R, Dressler LG et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study. *J Clin Oncol.* 2000; 18(10): 2059-69.
60. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer.* 1994; 73(3): 643-51.
61. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990; 250: 1684-89.
62. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994; 265: 2088-90.
63. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995; 378: 789-92.

64. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266: 66-71.
65. Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer*. 2000; 83: 1301-08.
66. Frank TS, Manley SA, Olopade OI et al. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2 correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2417-25.
67. The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91: 1310-16.
68. Ford D, Easton DF, Bishop DT et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*. 1994; 343: 692-5.
69. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K et al. Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer. *JAMA*. 1993; 269: 1970-74.
70. Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. *JAMA*. 1995; 273: 577-85.
71. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001; 20: 4621-28.
72. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'Dair L, Pharoah P et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 1143-50.
73. Bignell GR, Barfoot R, Seal S, Collins N, Warren W, Stratton MR. Low frequency of somatic mutations in the LKB1/Peutz-Jeghers syndrome gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. 1998; 58: 1384-6.
74. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, Van den Helm B, Frants RR et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet*. 1996; 13: 114-6.
75. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998; 391: 184-7.

76. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998; 392: 402-5.
77. Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. Genomic basis for breast cancer: advances in personalized medicine. *Salud Publica Mex*. 2009; 51(2): 197-207.
78. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*. 2002; 31(1): 55-9.
79. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2007; 39: 165-7.
80. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet*. 2006; 38(8): 873-5.
81. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet*. 2006; 38: 1239-41.
82. Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, Reed MW, Pooley KA et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet*. 2007; 39(3): 352-8.
83. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9: 321-45.
84. Dictionary of Cancer Terms. National cancer Institute. <http://www.cancer.gov>
85. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*. 1993, 71: 3926-31.
86. Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2001; 11: 339-52.
87. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 5925-30.

88. Holmes FA, Fritsche HA, Loewy JW, Geitner AM, Sutton RC, Buzdar AU et al. Measurement of estrogen and progesterone receptors in human breast tumors: enzyme immunoassay versus binding assay. *J Clin Oncol.* 1990; 8: 1025-35.
89. McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 1006-15.
90. Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg.* 2000; 87: 405-9.
91. Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res.* 1999; 59: 529-32.
92. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD et al. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res.* 1999; 59: 5425-28.
93. Su JL, McKee DD, Ellis B, Kadwell SH, Wisely GB, Moore LB et al. Production and characterization of an estrogen receptor beta subtype-specific mouse monoclonal antibody. *Hybridoma.* 2000; 19: 481-7.
94. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 10578-82.
95. Esteva-Lorenzo FJ, Sastry L, King CR. The erbB-2 gene: from research to application. In *Hormones and Growth Factors in Development and Neoplasia*. Edited by Dickson RB, Salomon DS. New York: John Wiley & Sons; 1998:421-444.
96. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235: 177-82.
97. Esteva FJ, Pusztai L, Symmans WF, Sneige N, Hortobagi GN. Clinical relevance of HER-2 amplification and overexpression in human cancers. *Ref Gynecol Obst.* 2000; 7: 267-76.
98. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50: 4332-37.

99. Wood WC, Budman DR, Korzun AH, Cooper MR, Younger J, Hart RD. Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1253-59.
100. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 1994; 330:1260-66.
101. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph nodepositive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1346-60.
102. Paik S, Bryant J, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N: erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph nodepositive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90:1361-70.
103. Ravdin PM, Green S, Albain KS, Boucher V, Ingle J, Pritchard K. Initial report of the SWOG biological correlative study of C-erbB-2 expression as a predictor of outcome in a trial comparing adjuvant CAF T with tamoxifen (T) alone. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1998; 17: 374.
104. Jorge Diego L Buys, Lara Torres Cesar O, Ortiz Hidalgo Carlos. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología* 2007; 45(3): 126-40.
105. Press M, Anderson S, Dybdal N, Lieberman G, Mass R et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is superior to immunohistochemistry (IHC) for determining HER2 status: the Herceptin (R) experience. *Mod Pathol.* 2002; 15: 47.
106. Seidman AD, Fornier M, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2587-95.
107. Breast. In: American Joint Committee on Cancer.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York, NY. 2002: 171-80.
108. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 3628-36.
109. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 3244-48.

110. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Larry J, Fauci. Harrison's Principles of Internal Medicine. 2004, 16<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill.
111. Hille. Axons, ions and Dons. Science. 1992; 258(5079):144-5.
112. Mackinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-gated potassium channel. Nature. 1991; 350: 232-5
113. Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. Physiol Rev. 1992; 72: S69-S88.
114. Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. Curr Opin Neurobiol. 1995; 5: 268-77.
115. Bubien JK, Keeton DA, Fuller CM, Gillespie GY, Reddy AT, Mapstone TB et al. Malignant human gliomas express an amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> conductance. Am J Physiol. 1999; 276: 1405-10.
116. Pardo LA, Del camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. Oncogenic potential of EAG K (+) channels. EMBO J. 1999; 18: 5540-7.
117. Mu D, Chen L, Zhang X, See LH, Koch CM, Yen C et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. Cancer Cell. 2003; (3):297-302.
118. Ivanov DV, Tyazhelova TV, Lemonnier L, Kononenko N, Pestova AA, Nikitin EA et al. A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3 Lett. 2003; 539: 156-60.
119. Li S, Gosling M, Poll CT, Westwick J, Cox B. Therapeutic scope of modulation of non-voltage-gated cation channels. Drug Discov Today. 2004; 9 (24): 1045-54.
120. Arcangeli A, Becchetti A, Cherubini A, Crociani O, Defilippi P, Guasti L et al. Physical and functional interaction between integrins and hERG potassium channels. Biochem Soc Trans. 2004; 32: 826-37.
121. Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels proliferation and G1 progression. J Membr Biol. 1996; 154: 91-107
122. Wang GX, McCrudden C, Dai YP, Horowitz B, Hume JR, Yamboliev IA. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SKG. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: 533-44.

123. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA et al. Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem biophys*. 2002; 36: 41-66.
124. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42: 283-323.
125. Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M et al. Contribution of functional voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: lateral motility. *J Cell Physiol*. 2003; 195: 479-87.
126. Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> ion channel blockers. *J Neurosci*. 1999; 19: 5942-54.
127. Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H et al. Herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res*. 2004; 64: 606-11.
128. Mackinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-gated potassium channel. *Nature*. 1991; 350: 232-5
129. Jan LY y Jan YN. Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels *J Physiol*. 1997; 1: 267-82.
130. Cayabyab FS, Schlichter LC. Regulation of EGR K<sup>+</sup> current by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2002; 277: 13673-81.
131. Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M et al. Cell cycle-dependent expression of *HERG1* and *HERG1B* isoforms in tumor cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 2947-55.
132. Pillozi S, Brizzi MF, Balzi M et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia*. 2002; 16: 1791-8.
133. Smith GA, Tsui HW, Newell EW et al. Functional up-regulation of HERG K<sup>+</sup> channels in neoplastic hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2000, 277: 18528-34.



134. Rodriguez GM, Rodriguez LW. PCR en tiempo real, Métodos físico-químicos en Biotecnología. IBT-UNAM 2006.
135. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific AND sequences. *Biotechnology*. 1992;10 (4): 413-7.
136. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification *Biotechniques*. 1997; 22: 130-8.
137. Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K<sup>+</sup> channel activity. *EMBO J*. 2002; 21 (8):1889-98.
138. Cherubini A, Hofmann G, Pillozzi S, Guasti L, Crociani O, Cilia E et al. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 2972-83.
139. Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*. 2000; 83: 1722-29.
140. Shao XD, Wu KC, Hao ZM, Hong L, Zhang J, Fan DM. The Potent Inhibitory Effects of Cisapride, a Specific Blocker for Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (HERG) Channel, on Gastric Cancer Cells. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4 (3): 295-301.
141. Valasek MA, Repa JJ. The power of real time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-9.
142. Yao, X., and Kwan, H. Y. (1999). Activity of voltage-gated K<sup>+</sup> channels is associated with cell proliferation and Ca<sup>2+</sup> influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci* 65, 55-62.
143. Mu D, Chen L, Zhang X, See LH., Koch CM, Yen C, et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*. 2003, 3, 297-302.

144. Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, and Stuhmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol.* 2005, 205, 115-124.
145. Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, and Stuhmer W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 1999, 18, 5540-5547.
146. Chen SZ, Zhang SH, Gong JH, Zhen YS. Erythromycin inhibits the proliferation of HERG K<sup>+</sup> channel highly expressing cancer cells and shows synergy with anticancer drugs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86(47):3353-7.
147. Hemmerlein B, Weseloh R, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez Araceli, Rubio M et al. Overexpression of Eag I potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer.* 2006; 5: 41-54.
148. Barajas LM, Bermudez D, Diaz L, Larrea F, Avila-Chavez E, Cadena A et al. Ether a go-go Potassium Channels as Human Cervical Cancer Markers. *Cancer Research.* 2004; 64: 6996-7001.
149. Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA, Bartolozzi B, Caporale R, Basile V, et al. VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K<sup>+</sup> channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood.* 2007, 110(4):1238-50
150. <http://www.ittumori.it/ITA/dipartimenti-oncologici/ricerca-ion-channels-cancer.shtml>
151. Masi A, Becchetti A, Restano-Cassulini R, Polvani S, Hofmann G, et al. hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines. *Br J Cancer.* 2005, 93(7):781-92.
152. Dolderer JH, Schuldes H, Bockhorn H, Altmannsberger M, Lambers C, von Zabern D, et al. HERG1 gene expression as a specific tumor marker in colorectal tissues. *Eur J Surg Oncol.* 2009 Jul 3. [Epub ahead of print]
153. Ding XW, Luo HS, Luo B, Xu DQ, Gao S. Overexpression of hERG1 in resected esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *J Surg Oncol.* 2008, 97(1):57-62.
154. Ding XW, Yang WB, Gao S, Wang W, Li Z, Hu WM, Li JJ, Luo HS. Prognostic Significance of hERG1 Expression in Gastric Cancer. *Dig Dis Sci.* 2009 Jun 3. [Epub ahead of print]
155. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene.* 2003, 22(49):7858-61.

156. Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2008, 7(2):271-9.
157. Pardo LA Del Camino D, Sanchez A, Alves F, Brüggemann A, Breckh S et al. Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *The EMBO Journal.* 1999; 18 (20): 5540-7.

# A N E X O 1

---

## PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE RNA PARA MUESTRAS INCLUIDAS EN PARAFINA (RecoverAll™, Ambion)

### DESPARAFINIZACIÓN

Se utilizaron muestras de tejido embebidas en parafina en cortes de 5 a 20  $\mu\text{m}$  las cuales se trataron con 1 ml de xilol al 100%. A continuación se incubaron a 50° C por 3 minutos (Labnet International Inc), se centrifugaron por 2 minutos a 15,000 rpm a temperatura ambiente (eppendorf 5804R), retiro el xilol y después se agregaron 1000  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%, centrifugó por 2 minutos a velocidad maxima a temperatura ambiente, se removió el etanol y se dejó secar por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.

### DIGESTIÓN CON PROTEASA

Por cada muestra se le agregaron 400  $\mu\text{l}$  de amortiguador de digestión (del kit comercial no está disponible su formula) y 4  $\mu\text{l}$  de proteasa (del kit comercial no está disponible su formula) incubándose a 50° C por 3 horas.

### AISLAMIENTO DE ÁCIDO NUCLÉICO

Posteriormente se agregó 480  $\mu\text{l}$  de aditivo para aislar, más 1.1 ml de etanol al 100%. Se pipetearon 700  $\mu\text{l}$  en un tubo nuevo con filtro, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos, se decantó el fluido se volvió a reinsertar el filtro dentro del mismo tubo. Agregaron 700  $\mu\text{l}$  de solución para lavar al filtro, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó el liquido y se reinsertó el filtro más 500  $\mu\text{l}$  de solución para lavado, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó, se reinsertó el filtro de nuevo y se volvió a centrifugar por 30 seg a 10,000 rpm.

### DIGESTIÓN CON NUCLEASA Y PURIFICACIÓN FINAL DEL ÁCIDO NUCLÉICO

A cada reacción se le agregaron 6  $\mu\text{l}$  de amortiguador de DNAsa, 4  $\mu\text{l}$  de DNAsa y 50  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas dentro del filtro y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 700  $\mu\text{l}$  de solución de lavado en el filtro, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó por 30 segundos, se decantó el líquido filtrado y se reinsertó dentro del mismo tubo. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de solución para lavado en el filtro, centrifugo por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó, se reinsertó el filtro a un tubo nuevo y aplicaron 30  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas calentada a 95°C, se incubó a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó y aplicó una segunda alícuota de 30  $\mu\text{l}$ , se centrifugó de nuevo y los eluidos se almacenaron a -20 °C.

## A N E X O 2

---

### TÉCNICA PARA REALIZAR LA RETROTRANSCRIPCIÓN

Se utilizó un Kit para retrotranscripción de Promega.

RNA a una concentración 1µg con 50µg de “random hexamers” y permaneció en el termociclador a 70°C por 5 minutos, posteriormente estuvieron 5 min. en hielo.

Se usó el coctel para cada muestra:

5x Amortiguador de RT	4µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4µl
Mezcla de DNTP a 10mM	1µl
Inhibidor de RNAsa (40U/µL)	0.5µl
Agua libre de nucleasa	4.5µl
Retrotranscriptasa	1µl

Las temperaturas programadas fueron: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos y 70°C por 15 minutos.

RT-PCR de invitrogen.

Para cada muestra lo siguiente a 65°C por 5 minutos.

1µg RNA	5µl
Random Hexamers (50 ng/µL)	2µl
Mezcla de DNTP a 10mM	1µl
Agua libre de nucleasa	2 µl

1 minuto en hielo para después agregarle el siguiente coctel a cada muestra por 42°C por 2 minutos

Amortiguador de RT a 10x	2 µl
MgCl <sub>2</sub> a 25mM	4 µl
DTT a 0.1M	2 µl
Inhibidor de RNAsa (40U/µL)	1 µl
Agua libre de nucleasa	2 µl

Posteriormente 1 µl de enzima retrotranscriptasa a cada reacción a 42°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos, 1 minuto en hielo, 1 µl de la enzima RNAsa H y se volvieron a colocar en el termociclador por 20 minutos a 37°C y finalmente se almacenaron en el congelador a -20°C.

## A N E X O 3

---

### TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

La cantidad de Master Mix a preparar es el necesario para el número de reacciones que se van a trabajar, considerando un total de 25  $\mu$ l por reacción, cambiando solamente el cDNA correspondiente de cada muestra y el par de oligonucleótidos específicos ( $\beta$ -actina humana y HERG1B).

Los oligonucleótidos para  $\beta$ -actina humana fueron diseñados dentro del laboratorio de genética molecular.

Los oligonucleótidos para HERG1B fueron diseñados a partir del artículo de Crociani O et al 2003 <sup>131</sup>.

Para HERG1B y para  $\beta$ -actina humana se preparó el coctel con 12.5 $\mu$ l Master Mix a 7mM, 1 $\mu$ l de oligonucleótido F, 1 $\mu$ l de oligonucleótido R (ambos a 20pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de cDNA, 8.5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 1 $\mu$ l de Syber Green.

El programa de PCR en tiempo real que se utilizó fue el siguiente:

2 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y 4°C al infinito.

## A N E X O 4

---

### TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica de inmunohistoquímica se realizó sobre cortes de parafina de 5 micras de espesor. Los cortes se introdujeron en una estufa de secado a una temperatura de 50° durante 24 horas. Tras desparafinarlos e hidratarlos se efectuaron los siguientes pasos:

- a)** Se realizó desenmascaramiento antigénico por calor: los cortes se trataron en tampón de citrato sódico 10mM, pH 6, en microondas a 750 w. de potencia, haciendo primeramente dos pases de 5 minutos cada uno. Se retiraron los cortes y se dejaron enfriar en el mismo tampón a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- b)** Se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno y se rodeó la muestra con Dako Pen.
- c)** Se retiró el exceso de PBS.
- d)** Se procedió a la incubación del anticuerpo primario policlonal (Anti-HERG1 APC-109; Alomone, Israel) con los siguientes pasos:
  - a.** Se realizó la dilución en albúmina bovina (sigma) al 0.1% en PBS de pH 7.5.
  - b.** Se realizó la dilución del anticuerpo en la albúmina bovina anteriormente preparada.
  - c.** Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- e)** Se realizaron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se retiró el exceso de PBS.

- f)** Se colocó el anticuerpo biotinado, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, previamente preparado con 1000  $\mu$ l de PBS más 10  $\mu$ l de NGS (Normal Goat Serum. Dako).
- g)** Se realizaron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se retiró el exceso de PBS.
- h)** Se inhibió la reacción de la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- i)** Se realizaron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se retiró el exceso de PBS.
- j)** Se formó el complejo streptavidina-biotina.peroxidasa previamente preparado con DUET (Dako) más 1000  $\mu$ l de PBS mas 10  $\mu$ l de reactivo A y 10  $\mu$ l de reactivo B. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- k)** Se realizarón 2 lavados con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se retiró el exceso de PBS.
- l)** Se realizó la tinción con diaminobencidina durante 10 minutos, para lo cual se preparó una solución con 1 tableta de DAB (Merk) más 10 mL de agua destilada más 10  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 3%.
- m)** Después se lavó con agua destilada durante 5 minutos y posteriormente se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 30 segundos.
- n)** Se lavó con agua estuada, se deshidrató, se aclaró y se montó.



diseño y corrección editorial

**D. C. V. Juan Luis Jiménez Peña**

Delfos, división diseño  
5512 8466