



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

METILACIÓN DE LOS GENES *PITX3* Y *AQP3* COMO BIOMARCADOR PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES CON ESTADIOS BENIGNOS DE LA ENFERMEDAD

TESIS

para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

presenta:

ZOILA ARELI LOPEZ BUJANDA

Hermosillo, Sonora.

Noviembre del 2009.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

METILACIÓN DE LOS GENES *PITX3* Y *AQP3* COMO BIOMARCADOR
PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA
EN MUJERES CON ESTADIOS BENIGNOS
DE LA ENFERMEDAD

T E S I S

para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

ZOILA ARELÍ LÓPEZ BUJANDA

Hermosillo, Sonora.

Noviembre del 2009

APROBACIÓN


Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Metilación de los genes *PITX3* y *AQP3* como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama en mujeres con estadios benignos de la enfermedad”, presentada por Zoila Arellí López Bujanda, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias.



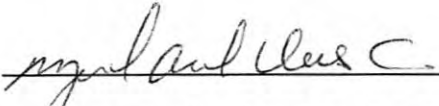
Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Asesor



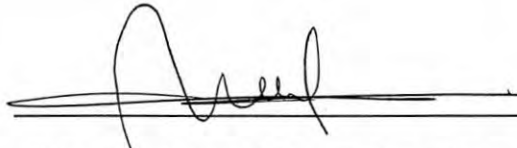
Dra. Graciela Caire Juvera
Sinodal



Dra. María Isabel Aramburo Rubio
Sinodal



Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias
Sinodal



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Sinodal

DEDICATORIA

Cuando se es pequeña se fantasea entre cuentos de hadas, criaturas mitológicas y mundos mágicos. En lo personal jamás he dejado de ser pequeña pero nunca imaginé jugar el papel de Alicia ni encontrar mi mundo maravilloso en Baltimore, en un lugar llamado “*Sukumar’s lab*”. Aún ahora me cuesta creer que el sueño fue real pues se profesa que son las princesas, y no las aldeanas de barrios baratos y educación pública, quienes al final de la jornada almuerzan perdices. Por mantenerme en la tropósfera cuando mis precipitadas alas querían sobrevolar al mundo, por estar junto a mí día a día pendiente de mis temores e inseguridades, porque creíste en mí cuando nadie apostaba a mi persona, porque me enseñaste a sobreponerme a mis circunstancias, porque a pesar de lo que diga Amado Nervo es de ti de quien he aprendido que infancia no es destino, porque para mí siempre serás la heroína que no deja de impresionarme, el modelo a seguir en el que espero convertirme algún día para mis hijos y de quien anhelo escuchar esas palabras. Por todo eso y más *mamá*, te dedico mi trabajo y mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, a la Dirección de Movilidad, Intercambio y Cooperación Académica, a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y al Posgrado en Biociencias por apoyarme durante mis estudios de Maestría, así como durante mi estancia académica en el Centro de Investigación en Cáncer de Mama “*Sidney Kimmel Comprehensive*”.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), al Instituto Nacional del Cáncer (NCI), a la Fundación Avon y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAyT) por apoyarme en todo momento durante mi trabajo experimental y en lo referente al proyecto binacional “*ELLA*”.

A mi director de tesis el Dr. Gutiérrez Millán, el hombre que no sólo me dió la oportunidad de realizar una tesis de maestría en su laboratorio, sino también de participar como asistente de investigación en lo que espero sea mi primer proyecto binacional de cáncer de mama. Por su apoyo y confianza en los momentos difíciles.

A mis asesores la Dra. Burboa Zazueta, la Dra. Aramburo Rubio, el Dr. Valdez Covarrubias y especialmente a la Dra. Caire Juvera. Por enseñarme, ayudarme, animarme, apoyarme y aguantarme todo este tiempo.

A la Dra. Sukumar y la Dra. Fackler con quienes he tenido la fortuna de trabajar, bajo la tutela del doctorando Wei Wen Teo y un excelente grupo de investigación de donde destaco a la doctoranda Helen Sadik con quien compartí departamento y quien me demostró ser una excelente persona.

A Martin por ayudarme a dibujar las figuras de esta tesis, enseñarme a utilizar el programa Fireworks y soportar mis exigencias.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme en las dificultades del día a día, por aconsejarme y apoyarme en lo académico y personal.

A mis amigos de licenciatura Cynthia, Larissa, Alondra, Anabel, Venecia y Alí quienes han seguido conmigo y con quienes he podido compartir fracasos y triunfos durante las horas de café.

A mis hermanas por apoyarme y prestar sus servicios publicitarios -se que pronto seré yo quien presuma sus logros- especialmente a Ameyalli por ayudarme a sobrepasar mi insensatez pues sin ella y sin el Dr. Ribera Claisse no quiero imaginar si estaría yo aquí.

A Eva por ayudarme con el lenguaje, por solventar mis frustraciones, pero sobre todo por brindarme su apoyo incondicional en la batalla más difícil que me ha tocado librar.

“Si alguna vez alguien nos plagia sin saberlo y en él lo ya sabido vuelve a ser un invento estaremos en él, invisibles pero reales, como otros ahora en mí”.

Gracias a todos por hacer posible la realización de este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	6
2.1 Aspectos Generales del Cáncer de Mama	6
2.2 Fisiología del Cáncer de Mama	7
2.3 El Ciclo Celular y su Alteración en la Célula Tumoral.....	12
a) Fases del ciclo celular.....	13
<i>i) Genes de mantenimiento de función</i>	<i>17</i>
<i>ii) Alteraciones en el DNA.....</i>	<i>19</i>
<i>iii) Reparación del DNA.....</i>	<i>20</i>
<i>iv) Apoptosis</i>	<i>21</i>
2.4 Genética del Cáncer de Mama.....	23
2.5 Epigenética del Cáncer de Mama	28
2.6 Progresión del Cáncer de Mama.....	34
2.7 Heterogeneidad del Cáncer de Mama.....	42
2.8 Detección Temprana del Cáncer Mamario	48
a) Diagnóstico del Cáncer de Mama.....	48
<i>i) Biopsia.....</i>	<i>50</i>
<i>ii) Metodología auxiliar.....</i>	<i>51</i>
b) Estudios <i>in vitro</i>	51
c) Avances en el Diagnóstico Molecular del Cáncer de Mama.....	53

2.9 Clasificación por Etapas o Estadificación del Cáncer de Mama	55
2.10 Susceptibilidad o Riesgo de Contraer Cáncer de Mama	59
2.11 Factores Pronóstico y Predictivos.....	65
2.12 Marcadores Tumorales	66
2.13 Tratamiento del Cáncer de Mama	70
2.14 Tratamiento Hormonal	76
2.15 Terapia Biológica	78
2.16 Otras Terapias Novedosas.	79
2.17 Resistencia al Tratamiento y Recurrencia	80
III. HIPÓTESIS.....	83
IV. OBJETIVOS.....	84
4.1 Objetivo General.....	84
4.2 Objetivos Específicos	84
V. MATERIALES Y MÉTODOS	85
5.1 Muestras Utilizadas en el Estudio	85
a) Líneas Celulares	85
b) Muestras Clínicas	85
5.2 Evaluación Histológica de Muestras de Tejido	86
a) Tinción Hematoxicilina/Eosina	86
b) Análisis de Marcadores	87
5.3 Análisis Múltiple de Metilación Específica y Cuantitativa por PCR en Tiempo Real (QM-MSP)	87
a) Aislamiento de DNA, Tratamiento y Purificación	87
<i>i) Extracción de DNA a partir de líneas celulares</i>	<i>87</i>
<i>iii) Extracción de DNA a partir de laminillas de tejido</i>	<i>90</i>

iv) <i>Hipermetilación del control CpG</i>	90
v) <i>Conversión de citosinas no-metiladas</i>	90
b) Diseño de Cebadores y Sondas	91
c) PCR Multiplex.....	92
d) PCR en Tiempo Real.....	92
5.4 Análisis de Expresión Genética.....	95
a) Aislamiento y Cultivo de Células Epiteliales de Glándula Mamaria Humana (HMEC).....	96
b) Aislamiento de RNA, PCR de Transcripción Reserva, PCR en Tiempo Real y PCR Convencional	96
i) <i>Extracción de RNA a partir de líneas celulares</i>	96
ii) <i>PCR de transcripción reversa (RT-PCR)</i>	97
iii) <i>PCR en tiempo real</i>	97
iv) <i>PCR convencional</i>	98
5.5 Análisis Estadístico de los Resultados.....	99
VI. RESULTADOS.....	101
6.1 Evaluación del Método de Análisis de Metilación Específica y Cuantitativa de Múltiples Genes por PCR en Tiempo Real (QM-MSP) en Líneas Celulares y Muestras de Tejido Microdisectadas	101
a) Tratamiento con Bisulfito de Sodio.....	101
b) Análisis de Metilación en Líneas Celulares	102
c) Análisis de Metilación en Tejidos Microdisectados.....	105
6.2 Análisis de Metilación en Muestras de Tejido	107
a) PCR multiplex de Muestras de Tejido.....	108
b) PCR en Tiempo Real de Productos de PCR multiplex	109
6.3 Análisis de la Regulación de la Expresión Genética	110
a) Evaluación de la Expresión Relativa de Líneas Celulares	110
b) Tratamiento Desmetilador en la Línea Celular ZR7530	112

VII. DISCUSIÓN	114
7.1 Evaluación del Método de Análisis de Metilación Específica y Cuantitativa de Múltiples Genes por PCR en Tiempo Real (QM-MSP) en Líneas Celulares y Muestras de Tejido Microdisectadas	114
7.2 Análisis de Metilación en Muestras de Tejido	117
7.3 Análisis de la Regulación de la Expresión Genética	118
VIII. CONCLUSIONES	119
IX. RECOMENDACIONES	120
X. LITERATURA CITADA	122
ANEXO 1	153
GLOSARIO	153
ANEXO 2	173
The ELLA Binational Breast Cancer Study: Design, Implementation, and Preliminary Results.....	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiología mamaria, sus componentes celulares y morfogénesis alveolar.....	8
Figura 2. Modelo hipotético de la jerarquía y diferenciación de células madre humanas de epitelio mamario.....	11
Figura 3. Ciclo celular de células mamarias.....	16
Figura 4. Capacidades adquiridas en el cáncer.....	24
Figura 5. Inactivación del cromosoma X en ratón.....	30
Figura 6. Patrón de metilación alterado en tumorigénesis.....	32
Figura 7. Mapa de la modificación de histonas en un cromosoma de una célula normal y cancerosa.....	33
Figura 8. Modelo lineal de múltiples pasos de la progresión del cáncer de mama humano.....	36
Figura 9. Modelos hipotéticos que explican la heterogeneidad intratumoral y evolución tumoral.....	44
Figura 10. Orígenes de las células madre de cáncer.....	45
Figura 11. Subtipos de cáncer de mama según su estatus de marcadores inmunohistoquímicos.....	47
Figura 12. Comparación de la progresión clínica del cáncer de mama antes y después del tratamiento.....	64
Figura 13. Gestión epigénética del cáncer.....	70
Figura 14. Diagrama de tratamiento locorregional del estadio clínico I, IIA o IIB (T3, N1, M0).....	73
Figura 15. Diagrama de estrategias de tratamiento para cáncer de mama metastásico, considerando algunas características del tumor.....	75
Figura 16. Diagrama de terapia sistémica adyuvante en mujeres con enfermedad positiva a receptores hormonales y HER2 negativo.....	77
Figura 17. Diagrama de terapia sistémica adyuvante en mujeres con enfermedad negativa a receptores hormonales y HER2 positivo.....	78
Figura 18. Inactivación y reactivación seriada de un camino de reparación del DNA en un tumor.....	82

Figura 19. Diagrama metodológico.....	86
Figura 20. Región UTR y exón uno del gen <i>AQP3</i>	92
Figura 21. Análisis múltiple de metilación específica y cuantitativa por PCR en tiempo real (QM-MSP).....	94
Figura 22. Condiciones del cultivo celular y tratamiento de des-metilación de la línea de cáncer de mama ZR7530.....	99
Figura 23. Curva estándar de los controles de DNA metilado y no-metilado (CpG y HSD, respectivamente).....	103
Figura 24. Perfil de metilación de líneas celulares.....	105
Figura 25. Lesiones sincrónicas de cáncer de secciones de tejido congelado antes de la microdissección por laser (MLD).	106
Figura 26. Índice de metilación acumulado (CMI) de muestras de tejido microdisectadas y analizadas por QM-MSP.....	107
Figura 27. Electroforesis en gel de los productos de la PCR multiplex de los genes <i>AQP3</i> y <i>PITX3</i>	109
Figura 28. Índice de metilación acumulado (CMI) de muestras de tejido y analizadas por QM-MSP.	110
Figura 29. Expresión relativa del gen <i>AQP3</i> en líneas celulares con la región promotora del gen no-metilado y metilado.....	111
Figura 30. Electroforesis en gel de los productos de la PCR de transcripción reversa de los genes <i>AQP3</i> y <i>GAPDH</i> en varias líneas celulares.	112
Figura 31. Electroforesis en gel de los productos de la PCR de transcripción reversa de los genes <i>AQP3</i> y <i>GAPDH</i> de la línea celular ZR7530 tras el tratamiento desmetilador.....	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Recomendaciones para la detección y prevención del cáncer de mama en EEUU.....	49
Tabla 2. Estadificación TNM para cáncer mamario.....	56
Tabla 3. Factores de riesgo para el cáncer de mama.	59
Tabla 4. Factores pronóstico en el cáncer mamario con ganglios negativos.....	81
Tabla 5. Características de las líneas celulares analizadas y condiciones de cultivo.	88
Tabla 6. Cebadores para el análisis de metilación.....	95
Tabla 7. Cebadores para el análisis de expresión genética.....	98
Tabla 8. Características de la muestras del estudio.	108

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor mortalidad no sólo en México sino en el mundo y las posibilidades de supervivencia dependen primordialmente de la celeridad con que sea descubierta la enfermedad, así como del tipo y subtipo de cáncer. Actualmente se investiga el uso de biomarcadores que permitan la clasificación de subtipos, así como la detección temprana de la enfermedad. Se investigó si el índice de metilación acumulada de los genes *AQP3* y *PITX3* puede ser utilizado como biomarcador de diagnóstico, pronóstico y de regulación epigenética de la expresión genética del cáncer de mama en mujeres con estadios benignos. El análisis inicial de metilación específica y cuantitativa de múltiples genes por PCR en tiempo real (QM-MSP) de 22 muestras de tejido microdisectado mostró diferencia significativa entre la metilación del tejido canceroso y el normal adyacente ($p=0.0312$), y ninguna diferencia entre DCIS progresivo e IDC. Esto sugiere que la metilación de los genes *PITX3* y *AQP3* podría ser utilizada como un indicador de la habilidad de un carcinoma *in situ* de progresar a carcinoma invasivo. El análisis posterior de un panel de 72 muestras validó la diferencia entre tejido canceroso y el tejido normal ($p=0.0348$), y los resultados para DCIS ($f_i=0.20$), IDC ($f_i=0.55$) y metástasis ($f_i=0.46$) concuerdan con el análisis previo; sin embargo, algunos casos no presentaron metilación en estos genes y no fue posible probar la hipótesis. Del mismo modo el análisis de metilación de estos genes en 46 líneas celulares no mostró que ésta está relacionada con el subtipo celular (luminal contra basal). Además se encontró que la expresión del gen *AQP3* es regulada por metilación específicamente en el área promotora evaluada y los resultados sugieren que la proteína AQP3 podría jugar un papel importante en el seno normal y su pérdida estar ligada a la invasión en cáncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the primary cause of cancer death neither among Mexican women but globally and survival rate is in the hands of early detection, and breast cancer subtype. Currently biomarker's research for early detection and the classification of breast cancer subtypes in an observation independent assay is carrying out. With this in mind a cumulative methylation index analysis was performed in the genes *PITX3* and *AQP3* in order to determine if they can be useful as biomarkers in diagnosis, prognosis and epigenetic regulation of gene expression of breast cancer in women with benign stages, all during a three months academic stay in Johns Hopkins University. The data from 22 microdissected tissues analyzed by real time quantitative multiplex methylation-specific PCR (QM-MSP) shows significant differences in methylation between adjacent normal and cancer tissue, except for pure DCIS ($p=0.0312$) but not difference between progressive DCIS and IDC, these results suggest that those DCIS with methylation in *PITX3* and *AQP3* genes could progress to invasive carcinoma. We also found in 72 tissue samples, a difference between adjacent normal tissue and carcinoma lesions ($p=0.0348$), and for DCIS ($f_i=0.20$), IDC ($f_i=0.55$) and metastases ($f_i=0.46$) we had similar results to the prior analysis. Nevertheless, there were a few cases without methylation in these genes and we weren't able to demonstrate our hypothesis. In addition the analysis of a panel of 46 cell lines shows no difference between cell type and these genes methylation (luminal vs basal). Moreover, we found that methylation in the addressed region of the promoter regulates *AQP3* gene expression, also these results suggest that AQP3 protein could play an important role in normal breast and its depletion been linked to invasion in breast cancers.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) ocupa el primer lugar en causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, con más de 410,000 defunciones cada año (Ferlay *et al.*, 2001). En México y según los sondeos más recientes realizados por la Secretaría de Salud, la misma tendencia se observa en territorio nacional (SINAIS, 2007). La morbi-mortalidad por CaMa se concentra principalmente en los estados de la frontera norte del país (Nuevo León, Coahuila, Chihuahua, Sonora y Baja California Norte) en donde se diagnostican cerca del 30% del total de casos anuales. Es decir, en México cada hora se diagnostica una mujer con CaMa, de las cuales menos del 5% se encuentra en etapa *in situ*, por lo que la mayoría de las mujeres son diagnosticadas con tumores en etapas avanzadas, situación que reduce la sobrevida a dicha enfermedad (Secretaría de Salud, 2002).

El estado de Sonora subió al puesto 10 en mortalidad por cáncer en el 2005 tras haberse postulado en el puesto 9 un año antes y mantenido los cuatro años previos en el puesto número 12 (SINAIS, 2005).

Con el fin de incrementar el índice de supervivencia y la calidad de vida de las pacientes, la detección temprana de cáncer de mama se ha convertido en una estrategia importante de salud pública (Thomson *et al.*, 2004). Los programas de mastografías permiten la detección temprana, pero su sensibilidad se ve influenciada por muchos factores, incluyendo la densidad del seno y la histología del cáncer (Berg *et al.*, 2004). Actualmente la posibilidad de detectar las primeras manifestaciones de la enfermedad antes de ser reconocibles en un examen mastográfico o físico ha esperanzado a los científicos.

Desde el siglo la hiperplasia ductal atípica (ADH) y el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) fueron sugeridos como los estadios neoplásicos reconocibles más temprano en la progresión del cáncer de mama (Dupont y Page, 1985, Lakhani, 1999). Dicha relación directa y aparentemente precursora entre carcinoma ductal *in situ* y carcinoma ductal invasivo (IDC) fue sustentada por análisis de IDC sincrónico asociado con DCIS (Buerger *et al.*, 1999).

Recientemente, Moulis y Sgroi (2008) revisaron un modelo modificado de progresión del cáncer de mama de dos vías diferentes para la evolución de DCIS a IDC, sustentado por estudios basados en hibridación genómica comparativa (CGH) e índices de expresión genética generados de ADH, DCIS e IDC. Ellos dividieron los DCIS en tres categorías: DCIS de bajo, intermedio y alto grado. Los tumores de bajo grado expresan un único set de genes que es raramente visto en tumores de alto grado, y viceversa; por otro lado, los tumores de grado intermedio expresan el panel de genes -ya sea de tumores de bajo o alto grado- y son divididos dentro de cada vía de acuerdo al patrón de alteración genética que incluye ganancia de 1q y pérdida de 16q. Ésto sugiere que no todos los DCIS son iguales, que DCIS tempranos y tardíos son programados de manera diferente y que utilizando el modelo correcto es factible la detección de aquellos DCIS que cuentan con el potencial de progresar a IDC.

En la actualidad los científicos abordan la problemática anterior empleando biomarcadores, es decir biomoléculas producidas ya sea por el tumor o por el organismo en respuesta a la presencia de éste. Incluso se pretende poder utilizarlos como método de escrutinio para el cáncer de mama, a reserva de ser comparado con el estándar de oro, la biopsia (Fackler *et al.*, 2009; Reinholz *et al.*, 2005). El uso de biomarcadores ha cobrado auge y se ha sumado a la información del expediente médico del paciente que puede ser examinada para determinar la extensión de la enfermedad, como: examen físico, procedimientos radiológicos, exámenes patológicos y reportes quirúrgicos. De dicha información, el estadio del cáncer mamario es el indicador simple más confiable para el pronóstico y el estado de los ganglios linfáticos axilares y resulta ser el factor pronóstico aislado de mayor utilidad al momento de elegir tratamiento (una vez obtenido el reporte patológico) (Lyman *et al.*, 2005).

Con el fin de alcanzar la máxima supervivencia, recientemente la asignación del tratamiento se auxilia en biomarcadores, como receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PR), el receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2/neu) y la proteína Ki67, para asignar a la paciente un tratamiento individualizado y óptimo (Lemieux *et al.*, 2008; Esteva y Hortobagyi, 2004; Osborne *et al.*, 2003; Ross y Fletcher, 1998a). Aún cuando normalmente se habla del cáncer de mama como una sola enfermedad, de manera histológica pueden identificarse múltiples subtipos patológicos de cáncer mamario, los cuales se

diferencian por el aspecto histológico y el patrón de crecimiento del tumor, considerándose sólo cáncer verdadero al de característica invasiva (Giuliano, 2006; Fabbri *et al.*, 2008).

La notable heterogeneidad para cada tipo histológico establecido por diferencia en expresión genética ha dividido al cáncer de mama en varios subtipos con diferente resultado clínico. Así, se han distinguido cuatro subtipos: un subtipo positivo a receptores de estrógeno (ER+), que incluye células luminales A y B; un subtipo tipo-seno normal; otro ER-/HER2+; y un subtipo tipo basal que expresa genes característicos de células epiteliales basales y células mioepiteliales de seno normal y no expresan ER o HER2 (Sorlie *et al.*, 2001; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003; Sorlie, 2009; Banerjee *et al.*, 2006).

De manera histórica el manejo del cáncer se ha fundamentado en tres tratamientos básicos: cirugía, quimioterapia y radioterapia, aunque actualmente existen dos alternativas más, la terapia hormonal y la biológica. Estos dos últimos tratamientos han conseguido aumentar la supervivencia de las pacientes, con el inconveniente de que no pueden administrarse en todos los casos. Tanto la quimioterapia como la radiación ionizante se enfocan en producir daño en el DNA con la finalidad de inducir apoptosis y en menor medida necrosis (Vogel *et al.*, 2007). Sin embargo, su acción no sólo afecta al tejido tumoral sino también al tejido sano (Tierney *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 2001). Actualmente, tanto la terapia hormonal (ER y PR) como la biológica (HER2/neu) se utilizan como tratamientos dirigidos cuya acción es casi exclusiva sobre tejido tumoral (Brodowicz *et al.*, 2001; Piccart-Gebhart *et al.*, 2005).

Mientras los subtipos ER+ y HER2+ pueden ser tratados con terapia hormonal antiestrógenos o trastuzumab, respectivamente, el subtipo tipo-basal actualmente carece de terapia dirigida. Quizá esta sea la razón por la cual los cánceres tipo basal se han asociado con una respuesta más corta al tratamiento y tiempo libre de recurrencia, al no contar con los beneficios de este tipo de terapias (Nielsen *et al.*, 2004; Putti *et al.*, 2005; Van de Rijn *et al.*, 2002; Gradishar, 2005; Sotiriou *et al.*, 2003). Por lo anterior, la posibilidad de detectar este subtipo de cáncer de mama podría mejorar la habilidad de predecir resultados clínicos con el fin de administrar terapias específicas e individuales para la paciente, debido a que pacientes

con cáncer tipo basal podrían requerir terapias sistémicas más agresivas (Gradishar, 2005; Neve *et al.*, 2006).

A la fecha, el cáncer de mama tipo basal puede ser identificado con paneles de marcadores inmunohistoquímicos, como ER-PR-HER2 negativos algunas veces llamados “fenotipo triple negativo” o TNP (Haffty *et al.*, 2006), o más recientemente como ER/PR/HER2-negativo y EGFR/ Citoqueratina 5/6-positivo, lo que es de utilidad al pronosticar la supervivencia de pacientes (Cheang *et al.*, 2008). Sin embargo, resulta importante contar con una clasificación molecular más fina, para lo que son necesarios nuevos biomarcadores.

En el último par de décadas se ha demostrado que la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras de genes es un evento común y temprano en la carcinogénesis, incluyendo cáncer de mama (Esteller, 2007; Lo y Sukumar, 2008; Agrawal *et al.*, 2007; Egger *et al.*, 2004; Jones y Baylin, 2002) y se asocia frecuentemente con supresión de la expresión genética mediante un proceso llamado silenciamiento epigenético (Esteller, 2008; Herman y Baylin, 2003; Baylin y Herman, 2000; Jones y Baylin, 2002), lo que ha hecho de la metilación en el DNA un atractivo paradigma para la detección de cáncer a través de metilación genética diferencial entre tejido normal contra tejido tumoral (Visvanathan *et al.*, 2006).

El concepto de que la metilación genética puede ser usada para el diagnóstico del cáncer de mama ya ha sido probado por varios estudios (Evron *et al.*, 2001; Fackler *et al.*, 2004; Fackler *et al.*, 2009; Fackler *et al.*, 2006), por lo cual ahora la investigación debe orientarse a buscar si la metilación genética de los carcinomas ductales *in situ* puede predecir comportamiento clínico futuro al estar relacionado con estadios tempranos de cáncer de mama invasivo y el riesgo de metástasis distante, debido a que esta última es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer y por lo tanto la habilidad de distinguir malignidad de cambios benignos sería de crucial importancia para incrementar los índices de supervivencia.

A la fecha se cuenta con el modelo de Gail que permite predecir el riesgo de una mujer menor de 35 años de desarrollar la enfermedad (Bondy *et al.*, 1994; Spiegelman *et al.*, 1994), aunque sus resultados no pueden ser completamente extrapolables a la población mexicana

pues se basan en estudios realizados con mujeres no hispanas. Es por eso que con este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de las bases moleculares del cáncer mamario, mediante la utilización de una técnica novedosa como la metilación epigenética, que ayude al diagnóstico temprano de la enfermedad, así como a su pronóstico, en un estudio independiente de edad y etnia.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Aspectos Generales del Cáncer de Mama

Una célula tumoral o neoplásica es una célula normal que ha escapado de los mecanismos reguladores que controlan su crecimiento y diferenciación (García-Foncillas, 2003). Por tanto, el desarrollo de un tumor o neoplasia tiene lugar cuando células de cualquier parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. En el caso de un tumor de mama, éste tiene su origen principalmente en las unidades funcionales de la glándula mamaria, conductos y lobulillos (Figura 1).

Mientras que los tumores benignos raramente son amenazas de muerte, las células que componen a los tumores malignos dan origen al proceso de invasión y destrucción de tejidos, puesto que poseen la capacidad de lograr una trasvasación exitosa al filtrarse al torrente sanguíneo, mediante la ruptura de moléculas de adhesión celular que sujetan las células a la membrana basal, con posterior destrucción de la misma, siendo este último tipo tumoral comúnmente conocido como cáncer (García-Foncillas, 2003; Giuliano, 2006) (Figura 1).

La palabra “cáncer” la acuñó Hipócrates en el año 400 años A.C. y deriva de karkinos (“cangrejo”, en griego), puesto que el padre de la medicina, como suelen llamarle algunos, identificó tumores internos en algunos pacientes con forma semejante a las pinzas de un cangrejo y que de alguna manera evolucionaban con un pronóstico fatal (Shelfer, 2009; Vera-Hernández *et al.*, 2001). Ahora sabemos que las células tumorales parecen desarrollarse de manera análoga a la evolución Darwiniana, en la cual cambios genéticos sucesivos confieren uno u otro tipo de ventaja en el crecimiento llevando a la conversión progresiva de una célula normal a cancerosa (Gagos *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2007; Nowell, 1976).

Para la formación del tumor son varios los cambios o alteraciones necesarias y su agresividad dependerá de los genes que se encuentren dañados. Las variaciones en el número de copias y/o estructura del genoma son particularmente importantes como eventos desregulatorios en la progresión del cáncer (Hyman *et al.*, 2002; Jeffrey *et al.*, 2005;

Kallioniemi *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 2004; Pollack *et al.*, 2002; Tirkkonen *et al.*, 1998). Hasta la fecha se han reportado cerca de mil genes que son desregulados por aberraciones genómicas recurrentes sólo en cáncer de mama (Fridlyand *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2002; Pollack *et al.*, 2002).

2.2 Fisiología del Cáncer de Mama

Entre el tejido normal del seno, que en su mayoría está compuesto por tejido fibroconectivo denso (estroma) entremezclado con tejido adiposo y con fibras elásticas, encontramos a los conductos y lobulillos (Wiseman y Werb, 2002), que juntos conforman la glándula mamaria. Ésta es un órgano estructuralmente dinámico, cuya diferenciación celular y remodelamiento comienzan poco antes de la pubertad, y varía con la edad, ciclo menstrual y estatus reproductivo (Osborne, 2000).

Durante la infancia el crecimiento de la glándula mamaria se ve limitado al crecimiento general del cuerpo. Hacia la pubertad, a la edad aproximada de 8-12 años el seno comienza a mostrar actividad de crecimiento tanto en el epitelio como en el estroma circundante (Russo y Russo, 1987). La glándula mamaria se compondrá ahora de dos linajes celulares: células epiteliales ductales que delinear el lumen de los conductos, también llamadas lumbales y células mioepiteliales que forman la capa basal de conductos y lobulillos o alveolos, mismas que delinear el parénquima mamario separándolo del estroma (Richert *et al.*, 2000; Williams y Daniel, 1983) (Figura 1).

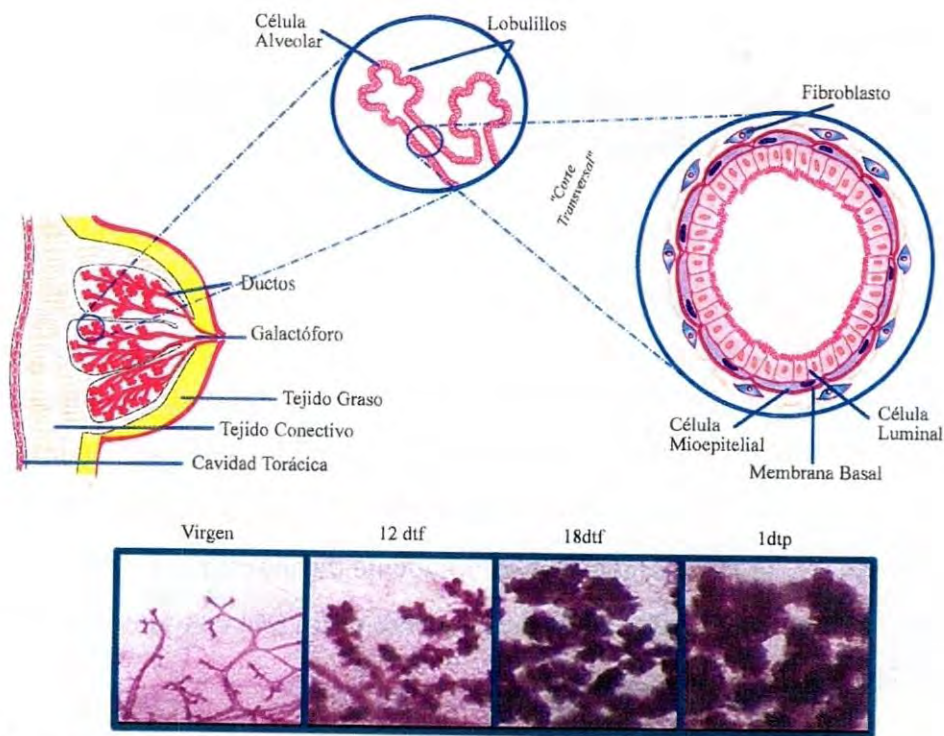


Figura 1. Fisiología mamaria, sus componentes celulares y morfogénesis alveolar. La arquitectura celular mamaria en virgen, 12 días tras la fecundación (dtf), 18 dtf y 1 día tras el parto (1 dtp) de glándulas mamarias murinas. Basado en (Brisken, 2002; Schedin, 2006; Wiseman y Werb, 2002; Oakes *et al.*, 2006).

Al llegar a la pubertad el seno sufre una reconstrucción de la estructura tipo árbol y se acrecentan las ramificaciones de conductos que tienen origen en el pezón (Hennighausen y Robinson, 1998), con el fin de producir una estructura que pueda secretar y expulsar copiosas cantidades de leche (Navarrete *et al.*, 2005; LaMarca y Rosen, 2008; Brisken, 2002) (Figura 1).

El ciclo menstrual dura entre 25 y 30 días y se divide en dos partes; la primera tiene lugar tras la menstruación y consiste en la fase folicular, con desprendimiento natural de un óvulo del ovario a la mitad de la fase (día 10-16) del ciclo. Ésta es seguida por la fase lútea donde el cambio hormonal controla el desarrollo y función de la glándula mamaria (Petersen *et al.*, 1987; Clarke *et al.*, 1997).

Durante la primera mitad del ciclo menstrual en la fase folicular (días 3-15) encontramos niveles bajos de progesterona (P) y altos de estrógenos (E) y de los receptores hormonales correspondientes: PR y ER (Markopoulos *et al.*, 1988), permaneciendo los lobulillos en estado relativamente quiescente (Wiseman y Werb, 2002). Mientras que la fase lútea (días 16-26) se caracteriza por un incremento en ambas hormonas (P y E), un mantenimiento en los niveles de receptores de progesterona (PR) (Anderson *et al.*, 1998; Soderqvist *et al.*, 1993) y una disminución en los de estrógeno (ER) (Markopoulos *et al.*, 1988). En esta segunda fase se alcanza la mayor división celular (en los días 22-25) (Longacre y Bartow, 1986; Potten *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1982; Mishell *et al.*, 1971) obteniéndose lobulillos bien desarrollados (Vogel *et al.*, 1981; Longacre y Bartow, 1986).

Sólo las células que raramente proliferan en la glándula mamaria, como los fibroblastos, son PR/ER positivos y están sujetas a la acción hormonal (Clarke *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1999). Las células epiteliales mamarias (MEC) normales, proliferativas en la glándula mamaria, son negativas a receptores de estrógenos (Clarke *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1999; Clarke, 2004) y son reguladas por células ER/PR-positivas por un mecanismo paracrino (Clarke *et al.*, 1997; Seagroves *et al.*, 2000; Brisken, 2002; Russo *et al.*, 2001). En contraste, algunas células MEC cancerosas son ER+ y algunos estudios sugieren que las células ER α -positivas representan a la población de células progenitoras epiteliales de la glándula mamaria (Smith, 2005; Welm *et al.*, 2002; Zeps *et al.*, 1998; Zeps *et al.*, 1996). En el día 27 camino a la menstruación la glándula involuciona debido a señales de degradación del epitelio y necrosis (Vogel *et al.*, 1981; Longacre y Bartow, 1986).

Resulta impresionante la característica de contraerse de los conductos a medida que se incrementan las ramificaciones (número de conductos) con la edad, pues con cada ciclo menstrual hay un nuevo nacimiento hasta la edad aproximada de 35 años, cuando la glándula mamaria alcanza una plenitud en su crecimiento (Benedek *et al.*, 1979). En búsqueda de una explicación, desde hace cuatro décadas los científicos propusieron que en el anclaje de la glándula mamaria existían células madre entre la población de células epiteliales, como en el caso de otros órganos (Osawa *et al.*, 1996; Janes *et al.*, 2002; Marshman *et al.*, 2002), con una capacidad de auto-renovación y de generar células hijas capaces de diferenciarse en tantos

linajes celulares diferentes como la glándula mamaria puede formar (Seaberg y Van der Kooy, 2003; Hoshino y Gardner, 1967; Smith *et al.*, 2002; Young *et al.*, 1971; Kordon y Smith, 1998; Chepko y Smith, 1997).

La aceptación de esta teoría se ha incrementado en los últimos años gracias a la biología de la glándula mamaria (Woodward *et al.*, 2005; Shackleton *et al.*, 2006) y estudios recientes que secundan su existencia (Wicha *et al.*, 2006; Dontu y Wicha, 2005; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Dontu *et al.*, 2004a; Dontu *et al.*, 2004b; Dontu *et al.*, 2003a; Dontu *et al.*, 2003b; Stingl *et al.*, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Smith y Boulanger, 2003), al grado de conseguir purificar una población de células madre mamarias (Shackleton *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006), aunque aún tiene que establecerse la relación entre esta población de células posnatales con la células madre embrionarias y de proponer un modelo en donde tanto las células luminales como mioepiteliales provienen de células multipotentes comunes (LaMarca y Rosen, 2008), como investigaciones anteriores sugerían (Dontu *et al.*, 2003b; Asselin-Labat *et al.*, 2006; Allred *et al.*, 2004; Smalley y Clarke, 2005; Stingl *et al.*, 2005).

Para que la glándula mamaria tenga la habilidad de auto-renovarse por tiempo indefinido, es necesario que las células madre en ella sean capaces de llevar a cabo división asimétrica. Así, en cada división celular se generará una célula que es idéntica a la célula madre y otra diferente que recibirá un patrón de diferenciación. Las células idénticas mantienen el compartimiento de células madre a través del tiempo; las distintas células sufren una serie de divisiones y pasos de diferenciación que resultan en la generación de poblaciones de células diferenciadas terminales. Las células en los estadios intermedios entre células madre y células diferenciadas terminales son usualmente referidas como progenitoras o células en tránsito (Potten y Loeffler, 1990). Aún cuando ambas células se dividen y producen similares productos finales (un rango de progenie diferenciada), difieren en su habilidad de proliferar y mantener un estado indiferenciado por un periodo prolongado de tiempo (Cariati y Purushotham, 2008) (Figura 2).

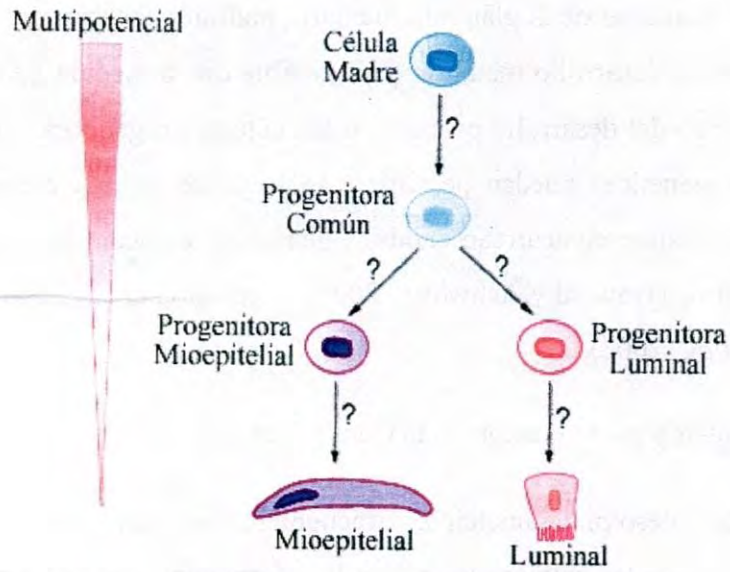


Figura 2. Modelo hipotético de la jerarquía y diferenciación de células madre humanas de epitelio mamario.

Basando en Cariati y Purushotham, 2008; Glazer *et al.*, 2007; Polyak, 2007.

Si el óvulo es fecundado, comienza la diferenciación de un tercer linaje de células epiteliales alveolares capaces de sintetizar proteínas de leche, (Richert *et al.*, 2000; Rudland *et al.*, 1998; Daniel y Smith, 1999). Este proceso dependiente de la señalización paracrina de células MEC positivas a receptores de estrógeno, progesterona y prolactina (Brisken, 2002; Neville *et al.*, 2002) se desencadena durante los días 2-12 del embarazo y da lugar a la glándula mamaria madura (Oakes *et al.*, 2006). En las mujeres con partos nulos, las células MEC nunca alcanzan esta diferenciación.

Después del parto y el subsecuente periodo de lactancia, la glándula mamaria sufre su ciclo natural que parece exigir la existencia de una población auto-renovable entre la glándula mamaria (Woodward *et al.*, 2005; Smalley y Ashworth, 2003). En dicho ciclo el desarrollo alveolar ganado durante el embarazo es removido por muerte celular programada (apoptosis) durante la fase de involución, sólo para ser reconstruido con el siguiente embarazo (Wiseman y Werb, 2002).

Las células madre de la glándula mamaria podrían albergar un potencial tumorigénico inherente durante el desarrollo mamario y es posible que a medida que los daños al DNA se acumulen a lo largo del desarrollo posnatal, estas células progenitoras afectadas adversamente por alteraciones genéticas puedan persistir a lo largo de la vida creando una población de células que potencialmente acarrean cambios genéticos, es decir, las supuestas células madre del cáncer de mama (Howard y Ashworth, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Smalley y Ashworth, 2003; Al-Hajj *et al.*, 2003).

2.3 El Ciclo Celular y su Alteración en la Célula Tumoral

El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como DNA, es la macromolécula donde las células almacenan la información genética usada para su desarrollo y funcionamiento, información que es agrupada en genes y transmitida de manera hereditaria a las células hijas por un mecanismo que deriva en la división celular conocido como “ciclo celular”. Éste es un proceso complejo en el cual algunos genes codifican para proteínas que desencadenan en la producción de hormonas o factores de crecimiento, capaces de salir de la célula; mientras que otros genes producen proteínas reguladoras, que pueden a su vez controlar la función de otras proteínas o regular la expresión genética.

La replicación de DNA normalmente se limita a una vez por ciclo celular y es continuada por una mitosis para generar dos células hijas, cada una con la misma cantidad de material hereditario. Cualquier daño en el DNA puede ser corregido en los puntos de restricción (o arresto) del ciclo celular; en caso contrario, la célula deberá detener el ciclo, aunque ocasionalmente este proceso puede fallar, transmitiéndose el daño en el DNA a la siguiente generación celular.

Si bien hasta principios de los años 90 se consideraba a la genética como el único medio de explicación tanto de los cambios evolutivos como de aquellos que dan origen a enfermedades como el cáncer, las investigaciones científicas han demostrado que dichos cambios no podían ser completamente explicados por permutas en la secuencia del material genético. Un buen ejemplo son tanto las gemelas monocigóticas como animales clonados: si en principio son genéticamente idénticos, ¿Cómo es posible que aún con la misma alteración en el gen

BRCA1 (que en principio es característico de cáncer de mama hereditario), una desarrolle cáncer de mama a los 25 años y otra a los 70? En la actualidad se conoce que aunque los genes son iguales, los interruptores que los encienden y apagan son distintos y lo que modifica el sistema de interruptores es el llamado "programa epigenético" que puede ser modificado por factores ambientales como el tabaco, la dieta o la actividad física (Fraga *et al.*, 2005; Humpherys *et al.*, 2001). Este descubrimiento ayudó a aclarar el modo en que las influencias ambientales inciden en la acción de los genes para modificar el funcionamiento del organismo. La epigenética actúa a través de cambios en la metilación del DNA y modificaciones de las histonas, asociadas con modificaciones en la cromatina, mediando el empaquetamiento del DNA (Lo y Sukumar, 2008).

a) Fases del ciclo celular

Son muchos los elementos involucrados en el ciclo celular con el fin de conseguir que la célula se reproduzca, sin embargo los más importantes son las quinasas dependientes de ciclina (CDK o CDC por "cell division cycle") y las ciclinas (Johnson y Walker, 1999; Nurse, 1997). Mientras que la concentración de CDKs se mantiene constante a lo largo del ciclo celular, las concentraciones de ciclinas varían en cada fase del ciclo siendo responsables de los complejos CDKs/ciclinas encargados de fosforilar sustratos proteicos específicos activando la síntesis de DNA y formando los componentes estructurales asociados con la mitosis, por lo que su actividad estará limitada por el estado de fosforilación que presenten las CDKs (Israels y Israels, 2001; Agami y Bernards, 2002). Ambas enzimas se clasifican en tres categorías según la fase en la que llevan a cabo su acción catalítica y todas ellas deben actuar oportuna y correctamente a lo largo de las cuatro fases ($G_1/S/G_2/M$) que componen el ciclo celular para una adecuada división (Figura 3).

Las tres primeras fases del ciclo celular (G_1 , S y G_2) comprenden la interfase, la cual es el periodo más largo en el cual se replica el DNA, se dividen los centriolos y se producen activamente un gran número de proteínas. A continuación, la célula se prepara para dividirse entrando en la profase, pro-metafase, metafase, anafase y telofase, para finalmente, una vez que cada grupo de cromátidas se encuentra en los polos -cada uno con su propia envoltura nuclear-, se lleva a cabo la citoquinesis; al conjunto de estas seis etapas se le conoce como "mitosis".

Como muchos procesos biológicos, el crecimiento celular tiene lugar gracias a señales exógenas. En el caso de la glándula mamaria dichas señales pueden ser endocrinas o paracrinas y son transmitidas gracias a receptores nucleares y de membrana como ER (receptor de estrógeno) y HER (receptor del factor de crecimiento epidermal o receptor epidermal humano) tras unirse a sus respectivos ligandos (estrógeno y EGF). De las dos familias de receptores uno de los integrantes de la familia HER, el HER2, empezó a llamar la atención de los investigadores debido a que es el sustrato común en la formación de dímeros entre HERs (Prossnitz *et al.*, 2007; Yager y Davidson, 2006; Levin, 2003; Horan *et al.*, 1995; Casalini *et al.*, 2004; Olayioye *et al.*, 2000).

Dichos receptores transmembranales serán activados cada mes en el seno produciéndose así las señales mitogénicas necesarias para que la célula del tejido mamario tome la decisión de salir del estado de senescencia conocido como G_0 y dividirse, dando lugar a una célula diferenciada en cada mitosis del ciclo celular (Wiseman y Werb, 2002). La estimulación hormonal a nivel de membrana se traduce en la expresión de protooncogenes, como *Ras*, que transcribirán las proteínas mitogénicas o factores de crecimiento necesarios para incrementar los niveles de ciclinas D que se asocian con CDK4 y CDK6 y regresar a G_1 (Muñoz, 1995; Agami y Bernards, 2002; Neufeld y Edgar, 1998; Sherr y Roberts, 1999). Estas CDK activadas inician la fosforilación de la proteína supresora de tumores del retinoblastoma (pRB), fosforilación que es completada poco más adelante por el complejo ciclina E/CDK2 (Smits y Medema, 2001; Zhang, 1999). Lo anterior parece permitirle a la célula entrar en la fase S (Agami y Bernards, 2002), donde la ciclina A desplaza a ciclina E del complejo para formar ciclina A/CDK2 (Smits y Medema, 2001).

En esta fase tiene lugar el desplazamiento hacia el núcleo de enzimas como la PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), una subunidad de la DNA polimerasa δ que favorece la síntesis de DNA y cuya ausencia induce la muerte de la célula (Naryzhny *et al.*, 2005), la timidilato sintasa (TS), la cual juega un papel primordial en la síntesis de DNA debido a que es la fuente *de novo* de dTMP (Berg *et al.*, 2001; Barnes *et al.*, 2000) y la ribonucleótido reductasa, encargada de catalizar la conversión del resto de los ribonucleótidos difosfato a su forma desoxi (Kolberg *et al.*, 2004); se produce la replicación del DNA con el

fin de duplicar el material genético y se expresan histonas necesarias para el empaquetamiento del mismo (Ford y Pardee, 1999). Al finalizar la síntesis de DNA la ciclina A se separa del complejo previamente formado para unirse con CDK1, también llamado CDC2 (Doree y Hunt, 2002).

A continuación se induce la síntesis de ciclina tipo B, la cual también forma complejos con CDK1 (Lundberg y Weinberg, 1999) y la célula entra en fase G2. Durante esta fase la proteína wee 1 se encarga de mantener al complejo ciclina B/CDK1 inactivo al fosforilarlo e impedir su entrada al núcleo (Nurse, 1997). En esta fase la célula continúa sintetizando proteínas necesarias para su división y con el fin de que ésta se haga de manera correcta cuenta con un punto de control al final de la fase (R), de manera que en caso de encontrarse daños en el DNA, éstos puedan ser reparados para continuar el ciclo hacia la siguiente fase. Para dicha transición es imprescindible concentraciones elevadas de ciclina B (Smits y Medema, 2001). La proteína wee1 es hidrolizada por CDC34 (Michael y Newport, 1998) y el complejo ciclina B/CDK1 es activado durante la profase por la acción de la enzima fosfatasa CDC25 (Perry y Kornbluth, 2007).

Al entrar la célula en metafase pasa, una vez más, por un punto de control, en el cual proteínas como MAD2, BUD3 y BUBR1 (Sudakin *et al.*, 2001) entre otras, pueden unirse a los cinetocoros e impedir la progresión a la mitosis si los cromosomas presentan alteraciones (Ford y Pardee, 1999). En caso contrario, la célula progresará a anafase gracias al complejo APC/C (complejo promotor de anafase) (Diaz-Martinez y Yu, 2007), en conjunto con su activador mitótico CDC20 y degradará primeramente a la ciclina A y después a la ciclina B, permitiendo la división de cromatidas hermanas y la descondensación de los cromosomas (durante la telofase) que constituirán el material genético de los dos células hijas (Peters, 2006; Yu, 2007).

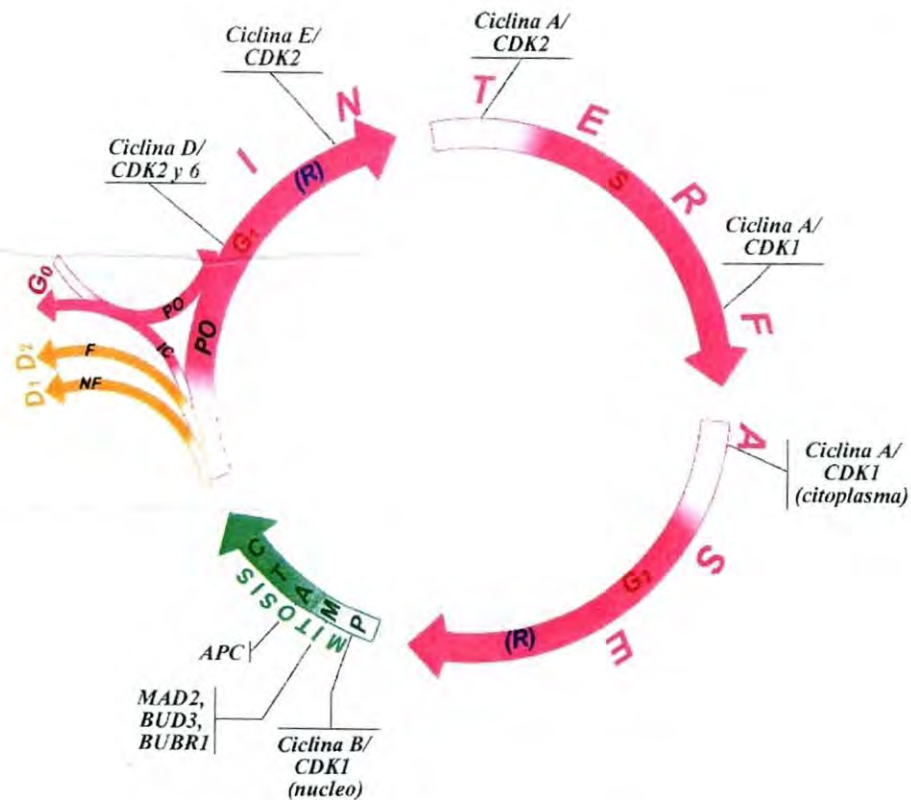


Figura 3. Ciclo celular de células mamarias.

En el punto de control (R) actúan genes supresores de tumores. Abreviaciones: P: profase; M; metafase; A: anafase; T: telofase; C: citoquinesis; PO: protooncogenes; IC: inhibidores de crecimiento; F: fecundación; NF: no fecundación.

Una vez concluido el ciclo, las CDKs 4 y 6 fosforilan a pRb, disociándola de E2F y permitiendo la transcripción de Emi1 (Hsu *et al.*, 2002), la cual inhibe la actividad de APC/C y desarrolla un papel fundamental en la replicación del material genético (Machida y Dutta, 2007). Véase las fuentes (Machida *et al.*, 2005; Bell y Dutta, 2002) para una mayor profundización.

Durante el principio de la fase G₁ se forma un complejo de seis proteínas llamado ORC (complejo de reconocimiento del origen) el cual se une a una región del cromosoma llamado origen de replicación. Seguido por las proteínas CDT1 y CDC6, quienes reclutan al complejo MCM2-7, el cual permitirá el acceso de factores necesarios para la replicación. A todo el conjunto de proteínas (ORC, CDT1, CDC6 y MCM2-7) se les conoce como pre-RC (complejo

de pre-replicación). Tras completarse el pre-RC los niveles de germinina y ciclina A aumentan regulados por Emi1, inhibidores independientes de DCT1, impidiendo la unión del complejo MCM2-7 y evitando así una segunda replicación (Machida y Dutta, 2007). Si la célula recibe señales mitógenas extracelulares que la inciten a dividirse, ésta progresará a través del ciclo celular como se ha descrito con anterioridad.

En el caso de que los inhibidores de ciclinas: p21 y p27 ejerzan su acción inhibitoria sobre CDK2, CDK4 y CDK6 (Muñoz, 1995; Johnson y Walker, 1999; Vidal y Koff, 2000), la pRb no será fosforilada y se detendrá el ciclo celular en el punto de control G₁ (Zhang, 1999). La síntesis de ambas proteínas es inducida por la proteína supresora de tumores p53 (Vidal y Koff, 2000; Sherr, 1994) y regulada corriente arriba por BRCA1 (Welch y King, 2001; Somasundaram *et al.*, 1997; Ouchi *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 1999).

Al ocurrir esto, la célula podrá reparar daños en el DNA (en caso de ser necesario) y asegurarse de que el pre-PC se ensambló correctamente para la síntesis de DNA, entrar a un estado de diferenciación inducido por señales paracrinas (relacionadas con la familia de receptores HER) de células vecinas en proliferación (Horan *et al.*, 1995; Casalini *et al.*, 2004), o abandonar el ciclo celular y entrar en estado G₀.

i) Genes de mantenimiento de función

A lo largo del apartado anterior se han detectado dos tipos de genes que juegan un papel primordial en el correcto funcionamiento del ciclo celular (Haber y Fearon, 1998): los llamados protooncogenes, que inducen la proliferación y diferenciación de la célula, y los genes supresores tumorales, que participan en la detención del ciclo en los puntos de control. Cuando los protooncogenes se encuentran alterados por mutaciones puntuales, translocaciones o amplificaciones genéticas, producen señales de crecimiento que pueden desembocar en una transformación celular y el desarrollo de cáncer, razón por la cual a la forma mutada o alterada de un protooncogén se le conoce como oncogén

En caso de producirse una alteración genética en un protooncogén, la mutación es de tipo dominante y es debida a una anomalía en un alelo del par génico, produciendo una proteína deficiente que mantiene constantemente encendido el receptor de crecimiento en la superficie de la célula, provocando que la célula se divida a pesar de no encontrarse presente ningún factor de crecimiento. El defecto se denomina mutación con ganancia de función, ya que la aberración aumenta o altera la función del gen, generándose un potencial oncogénico (Osborne *et al.*, 2004).

Un representante digno de la familia de protooncogenes es el gen *HER2*, cuya proteína estimula la mitogénesis inducida por ligando mediante la formación de complejos de señalización de homo y heterodímeros (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996; Janes *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1995). Un incremento en su concentración local, su ausencia de ligando de fosforilación y/o una mutación en una leucina del dominio transmembranal de activación del mismo traen como consecuencia un receptor que no requiere ser activado (Olayioye *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006) y que puede desencadenar en la formación de un tumor maligno de comportamiento peculiarmente agresivo (Bargmann *et al.*, 1986; Guy *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1988; Siegel *et al.*, 1994; Tovey *et al.*, 2009; Wulfing *et al.*, 2006).

Los genes supresores de tumores, los cuales deben su nombre a la capacidad que poseen de hacer que una célula cancerosa pierda su habilidad de proliferación (Harris *et al.*, 1969), se dividen en dos tipos: *gatekeepers* y *caretakers* (Kinzler y Vogelstein, 1997; Kinzler y Vogelstein, 1998). Los primeros actúan directamente como inhibidores de la proliferación celular o como promotores de apoptosis (ej. *p53* y *Rb*). Mientras que los *caretakers* no actúan directamente sobre la regulación del crecimiento celular, pero al mutarse causan inestabilidad genética (ej. *BRCA1* y *BRCA2*) (Kinzler y Vogelstein, 1997), aumentando la tasa de mutación de otros genes (*p53* y *APC*) (Lazar *et al.*, 1994) y promoviendo así el crecimiento celular de una forma indirecta (Kinzler y Vogelstein, 1997). En contraste con los protooncogenes, los genes supresores tumorales presentan mutaciones recesivas, manteniéndose el funcionamiento correcto mientras persista una copia normal, por lo que se requiere que ambos alelos se encuentren dañados (Knudson, 1993; García-Foncillas *et al.*, 2001). A este tipo de defecto se le denomina mutación con pérdida de función.

Si una célula recibe por herencia una alteración en uno de los alelos de un gen supresor tumoral *gatekeeper* requiere de un segundo evento denominado pérdida de heterocigosidad o pérdida de un alelo (Knudson, 1993). Mientras que si es un gen *caretaker* el que tiene la primera mutación en línea germinal se requiere de dos subsecuentes mutaciones somáticas, mismas que deberán ocurrir en las formas normales de los alelos de genes *gatekeeper* (Kinzler y Vogelstein, 1997).

El gen supresor tumoral *gatekeeper* más estudiado y mejor descrito es *p53* (Van Dyke, 2007), cuya pérdida de función se debe a una mutación puntual localizada en el dominio central de unión a DNA en cuando menos uno de los alelos del gen (Evan y Vousden, 2001). En un principio, si sólo un alelo del gen *p53* es mutado, el otro alelo sería capaz de controlar el ciclo celular; sin embargo, al parecer cuando uno de los dos alelos está mutado aparecen proteínas *p53* incapaces de unirse a las proteínas normales con las que forma el tetrámero activo, atenuando su actividad supresora (Muñoz, 1995).

ii) Alteraciones en el DNA

Las alteraciones que sufre el material genético pueden ser generadas por factores químicos, físicos y biológicos que interactúan con el DNA modificando principalmente su estructura primaria. Entre los químicos se tienen a los radicales libres de oxígeno por hipoxia o estrés oxidativo que pueden desaminar o hidroxilar bases nitrogenadas y agentes alquilantes como ciclofosfamida que forman uniones covalentes entre bases nitrogenadas (reticulación); entre los físicos se considera tanto a la radiación ionizante, como a la no ionizante (rayos X y UV) que pueden ocasionar roturas en el DNA; y por último, factores biológicos como la herencia parental y errores de la DNA polimerasa al incorporar uracilo (normalmente sólo encontrada en el RNA) en lugar de timina e incluso hidrólisis de enlaces N-glicosil (unidos a bases desoxiribosa) que resulta en la pérdida de una base dejando un sitio apurina/apirimidina (AP) (Lindahl, 1993).

Las alteraciones encontradas en el material genético van desde mutaciones puntuales tales como deleciones, inserciones y sustituciones, hasta mutaciones cromosómicas (deleciones y translocaciones) que favorecen la amplificación de oncogenes o la pérdida de

genes supresores tumorales (Lazar *et al.*, 1994; Futreal *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1994). Dichas anomalías estructurales pueden ser corregidas por la maquinaria de reparación del DNA. Si ésta es defectuosa, como resultado de una mutación adquirida o heredada, la tasa de acumulación de mutaciones en el genoma se eleva a medida que se producen divisiones celulares. Según el grado en que estas mutaciones afecten a oncogenes y genes supresores tumorales, aumentará la probabilidad de padecer neoplasias malignas.

iii) Reparación del DNA

Durante los puntos de control o arresto del ciclo celular en G₁ y G₂ la reparación del daño en el DNA esta a cargo de p53, entre otras proteínas importantes (Berns, 2006). Sin embargo, la célula cuenta con otras seis vías que actúan durante la fase S y en el punto de control G₂ para asegurar la correcta replicación del material genético. Éstas son: reparación de desigualdades (MMR), reparación de base escisional (BER), reparación de nucleótido escisional (NER), recombinación homóloga (HR), unión no homóloga de extremos (NHEJ) y síntesis de DNA tras lesión (TLS). Kennedy y D'Andrea proporcionan una explicación a detalle de estas seis vías (Kennedy y D'Andrea, 2006), las cuales se resumen a continuación:

MMR, BER y NER actúan para corregir una mutación puntual con la ayuda de la DNA polimerasa beta (de la vía TLS). MMR elimina desapareamientos de bases, así como bucles creados por inserción-delección de bases causadas a consecuencia de errores que comete la DNA polimerasa durante la replicación del DNA; BER elimina bases incorrectas como el uracilo, hidrolizando enzimáticamente el enlace glicosídico que las mantiene unidas a la desoxiribosa formando un sitio AP, mismo que será complementado con el nucleótido correcto (esta vía también puede rellenar sitios AP formados por hidrólisis errónea); NER elimina el nucleótido erróneo en forma de oligonucleótido, que posteriormente será reemplazado por los nucleótidos correspondientes utilizando la otra cadena como molde.

TLS reemplaza a la DNA polimerasa delta por otra (ej. polimerasa beta) que no detenga el proceso de replicación del DNA ante la presencia de bucle o dímeros de timina (Friedberg *et al.*, 2005), mientras que NHEJ y HR reparan las roturas en el DNA de doble cadena. El mecanismo del primero puede ocasionar deleciones o inserciones de pares de bases como

consecuencia del dúplex de DNA que se forma, mientras que HR actúa alineando las secuencias homólogas de DNA y parece ser más eficiente (Kennedy y D'Andrea, 2006). Existe considerable redundancia en la función de estas vías de reparación, de tal forma que si una es trastornada otra pueda compensar parcialmente la pérdida, especialmente si la segunda vía incrementa su actividad (Farmer *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2005).

Las células cancerosas surgen del daño al DNA que no ha sido reparado, observándose roturas cromosómicas, inestabilidad genómica y un alto índice de mutaciones. Sin embargo, la pérdida de al menos una de estas vías también incrementa la sensibilidad de la célula cancerosa al daño en su DNA, lo cual podría ser de utilidad en el tratamiento con radiación ionizante y quimioterapia, por lo que es importante poder identificar desórdenes hereditarios como la anemia Fanconi, donde las vías HR, NHEJ y TLS se encuentran trastornadas, con el fin de predecir el tipo de mutaciones que se producirán, la sensibilidad a fármacos de los tumores, así como su respuesta al tratamiento (Kennedy y D'Andrea, 2006).

iv) Apoptosis

En 1972 se propuso por primera vez que la célula contaba con un mecanismo de muerte celular programada, al que se denominó apoptosis (Kerr *et al.*, 1972). Ahora sabemos que dicho proceso es controlado en varios pasos, cada uno de los cuales se encuentra influenciado por proteínas pro- y anti- apoptóticas. El equilibrio entre la muerte celular inducida por la cascada de caspasas e inhibición de los procesos mediante proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) constituye un punto de decisión fundamental para la supervivencia de los organismos pluricelulares. Las IAPs no sólo controlan la muerte celular, sino también influyen en los caminos de transducción de señales, movimiento de proteínas y progresión a través del ciclo celular (Fadeel y Orrenius, 2005).

Una regulación anormal de la apoptosis produce la rotura de esta homeostasis y está involucrada en el desencadenamiento de una amplia variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer de mama (Fadeel y Orrenius, 2005; Hetts, 2000). Los diferentes tipos de tejido mamario deben responder a diferentes señales apoptóticas que inicien el mecanismo de muerte celular en forma diferente, aunque converjan en un punto común, como es la ruta de las

caspasas (Schmitt, 2003; Haq y Zanke, 1998; Green, 1998). El balance entre factores internos (los genes que exprese) y externos (las señales que reciba) le permite a la célula discernir entre entrar en G₀, diferenciarse, morir o, porqué no, estimular a células vecinas. Probablemente los fibroblastos estimulen paracrinamente a las células luminales a entrar en apoptosis durante la menstruación, aunque no se encontró ninguna referencia que confirmará dicha suposición.

Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos (pro-caspasas) que se activan por rotura proteolítica mediante dos vías alternativas (Fadeel y Orrenius, 2005): la extrínseca e intrínseca, detalladas a continuación.

La primera es dependiente de receptores, donde la supervivencia celular obedece a señales extracelulares en ausencia de las cuales la célula se suicida por el mecanismo de apoptosis. Algunos ejemplos de dichos activadores de muerte celular extracelular son: integrinas, ausencia de factores de crecimiento (estrógenos y dímeros de HER2) y citocinas de muerte celular (ligando Fas y factor de necrosis tumoral o TNF) (Wang *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2008; Lobanova *et al.*, 2007; Brodowicz *et al.*, 2001).

La vía intrínseca es dependiente de mitocondria, donde activadores de muerte intracelular como la familia de proteínas Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. Algunos miembros de la familia son anti-apoptóticos, ej. Bcl- 2 y Bcl-xL; y otros son pro-apoptóticos, ej. Bax, Bim, Bid, Bad y Bak (Wei *et al.*, 2001; Green y Reed, 1998).

Se sabe que p53 media la activación de apoptosis dentro de la célula que ha sufrido daños irreparables en su DNA. Aunque se desconoce el mecanismo, éste podría estar relacionado con la regulación de la expresión de moléculas pro-apoptóticas como Bax (Beneke *et al.*, 2000) y la represión paralela de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2 además de la inhibición de helicasas, lo que produce un poro en la membrana externa de la mitocondria que permite la liberación de numerosas proteínas de espacio intermembranal, entre ellas el citocromo C, quien una vez en el citosol activa un complejo proteico llamado apoptosoma, que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que ésta se activa, a su vez activa a las caspasas

efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis (Schmitt, 2003; Green, 1998; Kim, 2005).

En resumen, la respuesta final ante una lesión en el DNA depende del tipo de célula, del microambiente en el que se encuentra, de las proteínas que exprese y del grado de las lesiones en su material genético. Debido a que la apoptosis es generalmente un evento programado, la inactivación de genes pro- y anti- apoptóticos puede resultar en el desarrollo de resistencia celular contra fármacos.

2.4 Genética del Cáncer de Mama.

En el 2000 Hanahan y Weinberg publicaron por primera vez las alteraciones esenciales que actualmente rigen nuestro entendimiento del desarrollo de los cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama. Dichas alteraciones, que colectivamente dictan el crecimiento maligno y que le confieren capacidades novedosas durante el desarrollo del tumor son: evasión de apoptosis, auto-suficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejido y metástasis (Figura 4). Cada uno de estos cambios fisiológicos representa una infracción exitosa al mecanismo de defensa anti-cáncer y probablemente la multiplicidad en las defensas explicaría por qué el cáncer es relativamente raro durante el tiempo de vida promedio (Hanahan y Weinberg, 2000).



Figura 4. Capacidades adquiridas en el cáncer.
Fuente: Hanahan y Weinberg, 2000.

El aumento en el tamaño de las mamas se percibe a simple vista y tiene su fundamento en el ciclo celular bajo el mecanismo homeostático abordado anteriormente, que normalmente opera para asegurar el comportamiento apropiado de los tipos celulares del tejido mamario mediante señales mitogénicas o de anti-crecimiento, con el fin de preservar o no la vida de las células según las condiciones microambientales lo demanden (Fedi *et al.*, 1997).

Las células normales no pueden proliferar en ausencia de señales estimuladoras producidas por un tipo celular diferente del que se ve estimulado (señalización heterotípica) (Elenbaas y Weinberg, 2001), mientras que las células cancerosas adquieren la habilidad de sintetizar factores de crecimiento para los cuales son capaces de responder, creando una retroalimentación y reduciendo de esta manera su dependencia en señales exógenas provenientes del microambiente adyacente de tejido normal (Fedi *et al.*, 1997).

Por su parte, las señales anti-proliferativas operan para mantener la senescencia celular e impedir el crecimiento descontrolado característico del cáncer, ya sea forzando a la célula a salir del estado G_1 y entrar al G_0 , del cual podrá emerger en un futuro cuando las señales extracelulares lo permitan; o alternativamente induciendo a la célula a renunciar permanentemente a su potencial de proliferación al ser inducida a entrar al estado pos-mitótico, asociado con la adquisición de diferenciación específica. Ambos mecanismos incluyen tanto inhibidores de crecimientos solubles como embebidos en la matriz extracelular y receptores transmembranales de superficie. Por ello, las células cancerosas incipientes deben además evadir señales anti-proliferativas si quieren prosperar.

La proteína del fibroblastoma (pRb) es un buen ejemplo de proteína soluble que ejerce una acción anti-proliferativa. Cuando esta proteína se encuentra hipofosforilada secuestra y altera la función del factor de transcripción E2F que controla la expresión de grupos de genes esenciales para la progresión de la fase G_1 a S (Weinberg, 1995), por lo que la disrupción del camino pRb en una célula cancerosa liberaría a E2F y esto permitiría la proliferación celular, dejando a la célula insensible a estos factores de anti-crecimiento que normalmente operan para bloquear el avance a través de la fase G_1 del ciclo celular (Bosco y Knudsen, 2007; Radisavljevic, 2004).

Pero la historia apenas comienza pues la célula cuenta con un mecanismo de control suicida (apoptosis) que le ordena a la célula morir si el descontrol ocasionado en la misma es irreparable. La apoptosis es por tanto, como fuente principal del desgaste, una pieza clave que la célula tumoral debe evadir con el fin de proliferar y extenderse en número. La habilidad de evadir apoptosis puede ser adquirida por células cancerosas a través de una variedad de estrategias. La más común es la pérdida de reguladores pro-apoptóticos a través de mutaciones que involucran al gen supresor tumoral *p53* (Hussain *et al.*, 2000; Levine, 1997). La inactivación funcional de su producto resultante, la proteína p53, resulta en la remoción de un componente clave del sensor del daño al DNA que puede inducir la cascada apoptótica efectora.

Es importante destacar además que prácticamente todas las células normales no se replicarán permanentemente. Con excepción de las células madre, es ampliamente aceptado que la célula normal se dividirá un número finito de veces. Debido a que las células cargan un programa intrínseco y autónomo que limita sus multiplicaciones.

Durante cada ciclo celular se pierden alrededor de 50-100pb de DNA telomérico, el cual como su nombre indica constituye a los telómeros, quienes están compuestos de varios miles de repeticiones de secuencias de 6pb y comprenden los extremos de los cromosomas con la finalidad aparente de proteger el DNA cromosomal. Este acortamiento progresivo ha sido atribuido a la inhabilidad de la DNA polimerasa para replicar completamente el final 3' del DNA cromosomal durante cada fase S. La erosión progresiva de los telómeros a través de ciclos sucesivos de replicación eventualmente causa que pierdan la habilidad de protección. Los finales cromosómicos desprotegidos participan en la fusión cromosómica entre extremos, resultando en la muerte de la célula afectada (Counter *et al.*, 1992).

Evidentemente las células malignas han logrado superar este obstáculo al mantener sus telómeros intactos (Landberg *et al.*, 1997; Murillo-Ortiz *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2002; Shay y Bacchetti, 1997; Umbricht *et al.*, 1999); el 85-90% de ellas triunfan al sobreexpresar la enzima telomerasa, la cual añade repeticiones de hexanucleótidos a los extremos del DNA telomérico (Bryan y Cech, 1999). Esta observación avaló por primera vez la posibilidad de que los cánceres podían contener una subpoblación de células similares a las células madre epiteliales (Hamburger y Salmon, 1977; Lapidot *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2003; Al-Hajj *et al.*, 2003).

Hasta el momento se ha resumido una serie de características que la célula tumoral necesita para su desarrollo. Sin embargo, para que clones de la célula cancerosa puedan expandirse a un tamaño que constituya un tumor macroscópico que en un momento dado amenace la vida, no sólo es necesaria la interrupción del programa que limita las multiplicaciones de la célula, sino que también es requerido otro proceso fundamental para el crecimiento tumoral: la angiogénesis. El tamaño del tumor está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el microambiente, de este modo la célula no será capaz de multiplicarse indefinidamente a menos que pueda sobreexpresar factores que permitan a las nuevas células

nutrirse mediante neo-vascularización (angiogénesis: formación de nuevos vasos capilares), dichos factores son llamados “angiogénicos” (ej. VEGF).

Prácticamente todas las células normales están obligadas a residir a menos de 100 μm de distancia de un vaso capilar debido a la necesidad crucial tanto de oxígeno como de nutrientes para su función y supervivencia. Durante la organogénesis, esta cercanía es asegurada al coordinar el crecimiento de los vasos y el parénquima. Una vez el tejido está formado, el proceso de angiogénesis es transitorio y cuidadosamente regulado (Bouck *et al.*, 1996; Hanahan y Folkman, 1996; Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2005; Ceteci *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2004; Folkman, 1997).

Es probable que las células con lesiones proliferativas aberrantes carezcan inicialmente de la habilidad angiogénica, limitando su capacidad de expansión. Pues al aumentar el tamaño del tumor sus células se encuentran cada vez más alejadas de los capilares y hasta que finalmente el tumor deja de crecer por falta de nutrientes y oxígeno (Gasparini, 1999). Estos pequeños tumores permanecen latentes e incluso indetectables durante años y rara vez se asocian con metástasis. Con el fin de progresar a un tamaño mayor, las neoplasias incipientes deben desarrollar habilidad angiogénica. Esto se hace evidente en los casos en los que el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) adquiere un fenotipo angiogénico que induce la formación de nuevos vasos capilares y comienza a invadir el tejido próximo, razón por la cual el DCIS es un factor de riesgo asociado con el desarrollo subsecuente de cáncer invasivo (Giuliano, 2006).

No todos los tumores cuentan con la misma capacidad invasiva. Los tumores primarios que cuentan con dicha habilidad, tarde o temprano (independientemente del tamaño del tumor) utilizarán su progenie como células pioneras en el proceso de traslado, para invadir primeramente tejido adyacente, y de allí viajar a sitios distantes donde estas células puedan formar exitosamente nuevas colonias. Dichos asentamientos distantes de células tumorales son conocidos como “metástasis” (Sporn, 1996; Stetler-Stevenson, 1999).

Si bien, la capacidad de invasión y metástasis permite a las células cancerosas escapar de la masa del tumor primario y colonizar nuevos terrenos en el cuerpo donde los nutrientes y el espacio no están limitados, hay que destacar que el proceso es bastante complicado, pero

una simplificación se presenta a continuación: primeramente, es necesario que las células se separen entre sí mediante la ruptura de uniones célula-célula, lo cual puede ocurrir cuando la función de la proteína E-caderina se ve alterada (Christofori y Semb, 1999; Pecina-Slaus, 2003); posteriormente podría ser necesaria la destrucción de tejido adyacente (Benaud *et al.*, 1998; Hojilla *et al.*, 2003; Chambers y Matrisian, 1997), lo cual se ha intentado explicar por el hecho de que las células cancerosas presentan sobreexpresión de proteasas extracelulares mientras que la expresión de genes inhibidores de proteasas se encuentra deprimida (Werb, 1997; Stetler-Stevenson, 1999); y finalmente, puesto que la célula migrante experimentará cambios en los microambientes del tejido durante su viaje debe ser capaz de adaptarse, adheriéndose a sus nuevas vecinas tras cambiar la expresión del espectro de subunidades α o β de integrinas mostradas en su matriz extracelular (Lukashev y Werb, 1998).

2.5 Epigenética del Cáncer de Mama

Las seis alteraciones genéticas de la figura 4 son características de los cánceres humanos y la base de lo que conocemos respecto a ellos. Sin embargo, muchos de estos cambios, funcionalmente relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer, ocurren sin cambios a nivel nucleotídico, lo que llevó a los científicos a la hipótesis de que el cáncer no sólo era la consecuencia de mutaciones genéticas en oncogenes y/o genes supresores de tumores, sino que podían existir además factores no genéticos que interactuaran con los genes. Hoy en día sabemos que la epigenética (mecanismo no genético que regula la expresión genética que se explicará detalladamente más adelante) juega también un papel muy importante en la tumorigénesis (Baylin y Herman, 2000).

En humanos, el principal evento epigenético es la metilación del DNA. Dicha metilación ocurre en citosinas (C) que preceden a una guanina (G); estos pares de bases secuenciales son llamados dinucleótidos CpG (Herman y Baylin, 2003; Weber *et al.*, 2007), donde la “p” significa que están enlazadas la C y la G por un fosfato. Los sitios CpG no se distribuyen aleatoriamente en el genoma, sino que se encuentran en regiones ricas en CpG conocidas como “islas CpG”, localizadas en las regiones regulatorias de muchos genes. Estas islas normalmente carecen de metilación en células normales (Weber *et al.*, 2007; Herman y Baylin, 2003) y al encontrarse hipermetiladas se pierde la expresión genética, lo cual no ocurre

cuando citosinas precedidas por cualquiera de los otros tres nucleótidos son metiladas (Cameron *et al.*, 1999).

Varios genes supresores de tumores contienen islas CpG en sus promotores, y muchos de ellos muestran evidencia de silenciación por metilación. Tras haber ocurrido cambios asociados con desacetilación de histonas, las islas CpG se metilan y los genes relevantes se vuelven irrevocablemente silenciados (Figura 6) (Widschwendter y Jones, 2002).

La prueba contundente de que los cambios de metilación en tumores son de hecho la causa, y no meramente una consecuencia, de la formación del tumor fue publicada recientemente. Utilizando un modelo en ratón con un sólo alelo del gen *HIC1* en línea germinal, Yong Chen y colaboradores (2003) encontraron que la expresión del segundo alelo era posteriormente silenciada por hipermetilación de la región promotora de *HIC1*, ocasionando la pérdida de función de la proteína supresora de tumores y desencadenando el desarrollo de varios tumores malignos.

Widschwendter y Jones (2002) hicieron una revisión de genes silenciados epigenéticamente en la carcinogénesis del seno. Estos genes demostraron encajar en el modelo de Hanahan y Weinberg, jugando un papel crítico en las siguientes vías: ciclo celular (*Rb*), daño al DNA (*BRCA1*), apoptosis (*caspara-8*), invasión (*E-caderina*) y respuesta a factores de crecimiento (*ER*, *RAR β* y *RASSF1 α*).

Con el fin de entender los orígenes de las alteraciones epigenéticas en cáncer es necesario conocer el preciso patrón de metilación del DNA y las modificaciones de histonas esenciales para las actividades fisiológicas de las células y tejidos, pues la silenciación normal de genes específicos de tejido es utilizada anormalmente por las células precursoras de cáncer para producir el fenotipo transformado.

Una célula normal se sirve de mecanismos epigenéticos para diferentes fines, como asegurar la expresión monoalélica (Feinberg *et al.*, 2002), o la inactivación del cromosoma X en mujeres (Figura 5) (Reik y Lewis, 2005). Aparentemente muchos de los genes del cromosoma inactivo (Xi) presentan hipermetilación en sus regiones promotoras, asegurando el silenciamiento de dichos genes (Suzuki y Bird, 2008).

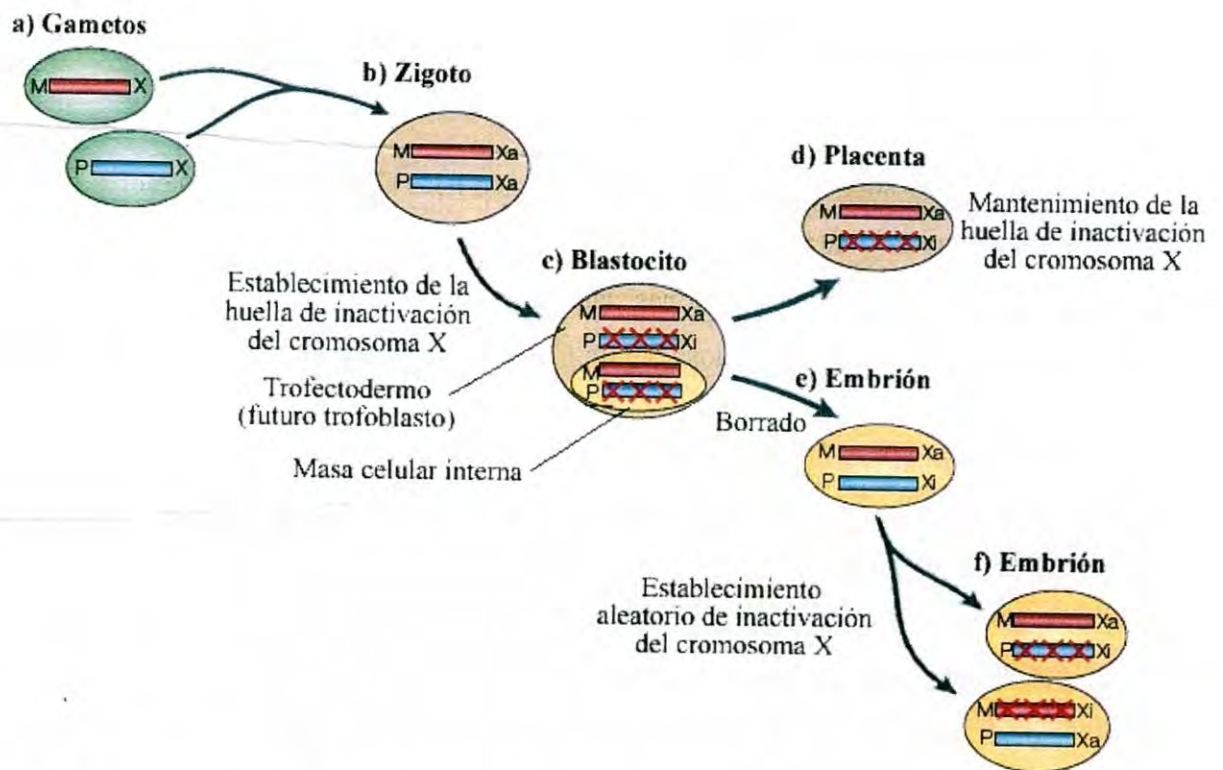


Figura 5. Inactivación del cromosoma X en ratón.

Los rectángulos rojos indican que el cromosoma X es de origen materno (M) y los azules de origen paterno (P). Los cromosomas X activo e inactivo son indicados por Xa y Xi, respectivamente.

Ambos cromosomas X en el cigoto (b) son potencialmente activos. La huella de inactivación del cromosoma X parental es establecida en todas las células durante el estado previo a la implantación del blastocito en la pared del útero (representado por las cruces rojas (c)). La huella es mantenida en la placenta y otros tejidos extra embrionarios (d), pero es borrada en el tejido embrionario (e). Entonces se establece la inactivación aleatoria del cromosoma X en las células embrionarias (f), conservándose a lo largo de la vida adulta.

Fuente: Reik y Lewis, 2005.

El control epigenético ocurre tanto en las islas CpG del DNA como en el núcleo de las histonas, modulando la estructura de la cromatina para formar eucromatina o heterocromatina y activar o silenciar la expresión genética (Esteller y Almouzni, 2005). La cromatina está formada por nucleosomas que a su vez están constituidos por un octámero de histonas (H2A, H2B, H3, y H4) envuelto por 147pb de la doble cadena de DNA (Kornberg y Lorch, 1999).

La metilación del DNA está limitada a la adición de un grupo metil al carbono de la posición 5 de la citosina en un dinucleótido CpG y es mediada por DNA metiltransferasas (DNMTs) que catalizan la transferencia del grupo metil de S-adenosil L-metionina (SAM) a una citosina en el dinucleótido CpG (Brenner y Fuks, 2006). Las DNMTs conocidas hasta la

fecha son DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L. Cuando el DNA que contiene un dinucleótido CpG simétricamente metilado es replicado, lo que resulta son dos dobles cadenas de moléculas de DNA, cada una conteniendo un dinucleótido CpG metilado en la cadena parental pero conteniendo un dinucleótido CpG no-metilado en la cadena recién sintetizada.

El estado metilado del sitio en la molécula parental es mantenido en las moléculas hijas cuando DNMT1 reconoce el sitio hemimetilado y metila la citosina no-metilada, restaurando la simetría de metilación del par dinucleotídico CpG (Tajima y Suetake, 1998), mientras que la metilación *de novo* es catalizada por DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L (Okano *et al.*, 1999; Chedin *et al.*, 2002). El patrón de metilación copiado tras la síntesis de DNA resulta en cambios heredables a la estructura de la cromatina.

En las figuras 6 y 7 se muestra como la expresión del RNA mensajero de un gen supresor tumoral ocurre en el contexto de un promotor no-metilado en su isla CpG y a través de cambios en la configuración de la cromatina mediante la modificación de histonas.

Las alteraciones en cáncer que involucran metilación del DNA son: (1) hipometilación global del DNA, con frecuencia entre grupos de genes (Greger *et al.*, 1989); (2) desregulación de la DNMT1 y potencialmente otras metiltransferasas (Karpf y Matsui, 2005; Mizuno *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 1999); (3) hipermetilación regional en islas CpG normalmente no-metiladas (Sakai *et al.*, 1991; Herman *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1995; Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 2006); y (4) activación y desactivación de genes de microRNA (Lujambio *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005; Brueckner *et al.*, 2007). En cada caso, el silenciamiento de genes reparadores del DNA bloquea la reparación de errores genéticos, abriéndose el camino a la transformación neoplásica de la célula.

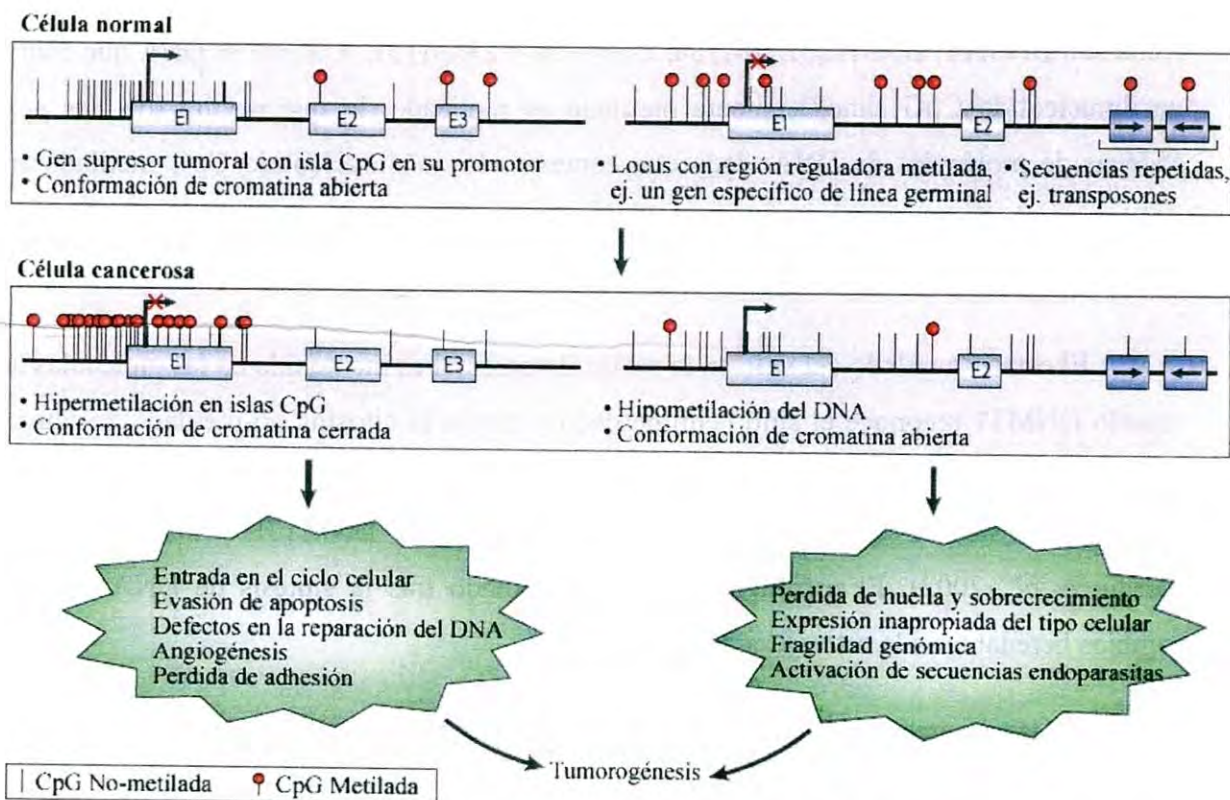


Figura 6. Patrón de metilación alterado en tumorigénesis.

E, exón.

Fuente: Esteller, 2007.

Por otro lado las histonas no son sólo proteínas de empaquetamiento, sino estructuras moleculares que participan en la regulación de la expresión genética mediante modificaciones químicas, guardando la información epigenética a través de modificaciones pos-traduccionales como la acetilación de lisina, metilación de arginina y lisina, y fosforilación de serina. Estas modificaciones afectan la transcripción de genes, reparación del DNA, replicación del DNA y la organización de cromosomas, formando el “código de histonas” (Jenuwein y Allis, 2001). La acetilación de lisinas en histonas, por ejemplo, generalmente se asocia con la activación transcripcional (Mack, 2006; Bernstein *et al.*, 2007). Por otro lado, las consecuencias funcionales de la metilación de histonas depende del tipo de residuo [lisina (K) o arginina (R)] y el sitio específico que la metilación modifica (ej. K4, K9, o K20) . La metilación de H3 en K4 está fuertemente vinculada con la activación transcripcional, mientras que la metilación de

H3 en K9 o K27 y de H4 en K20 está asociada con la represión transcripcional (Karpf y Matsui, 2005).

La hipermetilación de las islas CpG en regiones promotoras de genes supresores tumorales en células cancerosas se asocia con una combinación particular de marcadores de histonas: desacetilación de histonas H3 y H4, pérdida de trimetilación de H3K4, y ganancia de metilación de H3K9 y trimetilación de H3K27 (Ballestar *et al.*, 2003; Jones y Baylin, 2007). La presencia de la hipo-acetilación e hipermetilación de histonas H3 y H4 (Richon *et al.*, 2000) silencian ciertos genes con propiedades similares a los genes supresores tumorales, como *p21*, a pesar de la ausencia de hipermetilación en la isla CpG (Figura 7).

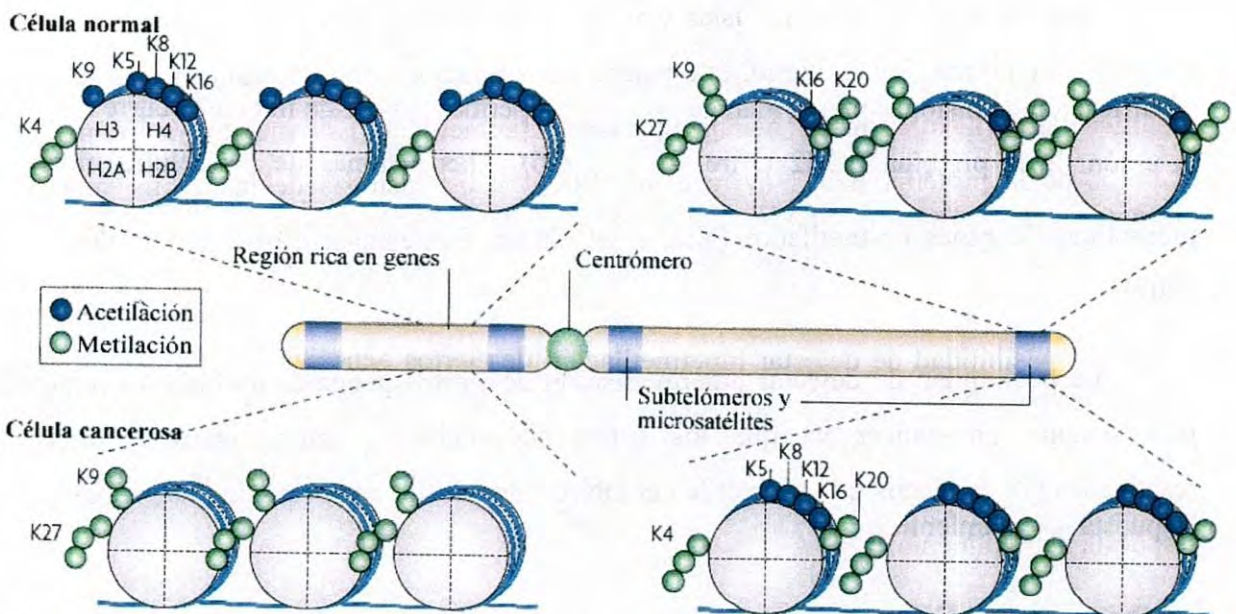


Figura 7. Mapa de la modificación de histonas en un cromosoma de una célula normal y cancerosa.

El bastón en el centro representa un cromosoma y cada círculo morado un nucleosoma. H, histona; K, lisina.
Fuente: Esteller, 2007.

El reconocimiento de que los eventos clave de inactivación genética juegan un papel en cáncer ha llevado al desarrollo de varias investigaciones en la búsqueda de nuevos genes silenciados epigenéticamente. Los reportes iniciales de hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras del gen supresor tumoral *Rb* (Greger *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 1991)

fueron seguidos del descubrimiento de que la hipermetilación en islas CpG es el mecanismo de inactivación de genes supresores tumorales como *BRCA1* (Esteller *et al.*, 2000).

El reconocimiento creciente de cambios epigenéticos en las islas CpG de un largo número de genes en diferentes cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama (Yang *et al.*, 2001), ha sido facilitado por avanzadas técnicas que permiten la rápida evaluación de cambios en la metilación de regiones promotoras del DNA, permitiendo identificar blancos novedosos de silenciación epigenética (Herman *et al.*, 1996; Xiong y Laird, 1997; Eads *et al.*, 2000; Galm *et al.*, 2002; Fackler *et al.*, 2004; Swift-Scanlan *et al.*, 2006).

Aun no se sabe como las islas CpG se vuelven hipermetiladas en algunos tipos de cáncer y no en otros. Sin embargo, esto podría tener relación con el mecanismo por el cual la modificación de histonas marca a un gen para ser hipermetilado. Este marcaje ocurre mediante la unión de la proteína EZH2 (Vire *et al.*, 2006) a las histonas de las células madre en promotores de genes no-metilados (Vire *et al.*, 2006; Schlesinger *et al.*, 2007; Ohm *et al.*, 2007).

La posibilidad de detectar hipermetilación de ciertos genes es un blanco prometedor para terapias anti-cáncer ya que los genes silenciados epigenéticamente podrían ser reactivados por fármacos que desmetilen el DNA, además, de ser un predictor potencial de la respuesta al tratamiento.

2.6 Progresión del Cáncer de Mama

Algunas líneas de evidencia indican que la tumorigénesis en humanos es un proceso compuesto de múltiples pasos que reflejan alteraciones genéticas que dirigen la transformación progresiva de células normales a sus derivados altamente malignos.

A medida que los tumores progresan, la inestabilidad genética de la célula se ve incrementada. El estrés oxidativo, la hipoxia, la falta de nutrientes y el bajo pH en el microambiente tumoral son algunas de las condiciones que contribuyen a esta inestabilidad dañando al DNA y causando problemas en sus vías de reparación (para una completa revisión de este tema consulte; (Bindra y Glazer, 2005). Se ha reportado además que el estrés en el

microambiente provoca que las células tumorales sobreexpresen proteínas HSP de choque térmico (Calderwood *et al.*, 2006), las cuales ayudan a proteínas dañadas como HER2 y p53 a re-empaquetarse en su conformación nativa, lo cual resulta beneficioso para la célula cancerosa pues promueve su crecimiento y supervivencia (Tsutsumi y Neckers, 2007).

El aumento de la proliferación de un grupo de células (debido a alteraciones iniciales en protooncogenes y genes supresores tumorales) y la posterior adquisición de la capacidad invasiva de estas células del tumor primario, les permite escapar de su lugar inicial, colonizar nuevas áreas y proliferar, ya sea en el tejido adyacente o diseminarse a través del sistema linfático o sanguíneo (metástasis). Para lograr un crecimiento progresivo de células en un sitio discontinuo del tumor primario (Welch *et al.*, 2000) las células deben eliminar las interacciones célula-célula/célula-matriz y ser capaces de unirse al nuevo sitio metastásico.

Cuando las células tumorales invaden las estructuras normales, éstas provocan fisuras en dichas estructuras que los fibroblastos, macrófagos y células endoteliales (ECs) del estroma intentarán sanar, resultando en una compleja comunicación cruzada entre el tumor y su microambiente, involucrando múltiples ligandos y vías de señalización celular (Stuelten *et al.*, 2005).

El proceso de transformación parece comenzar con transformaciones benignas como hiperplasia ductal atípica (ADH) y carcinoma ductal *in situ* (DCIS) como estadios neoplásicos pre-malignos, que según el modelo lineal (Figura 8) anteceden al desarrollo de carcinoma ductal invasivo (IDC) (Dupont y Page, 1985; Lakhani, 1999; Buerger *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2004; Simpson y Page, 2000; Yao *et al.*, 2006; Neve *et al.*, 2004) y pueden subsecuentemente metastatizar (Allred *et al.*, 2001; Burstein *et al.*, 2004).

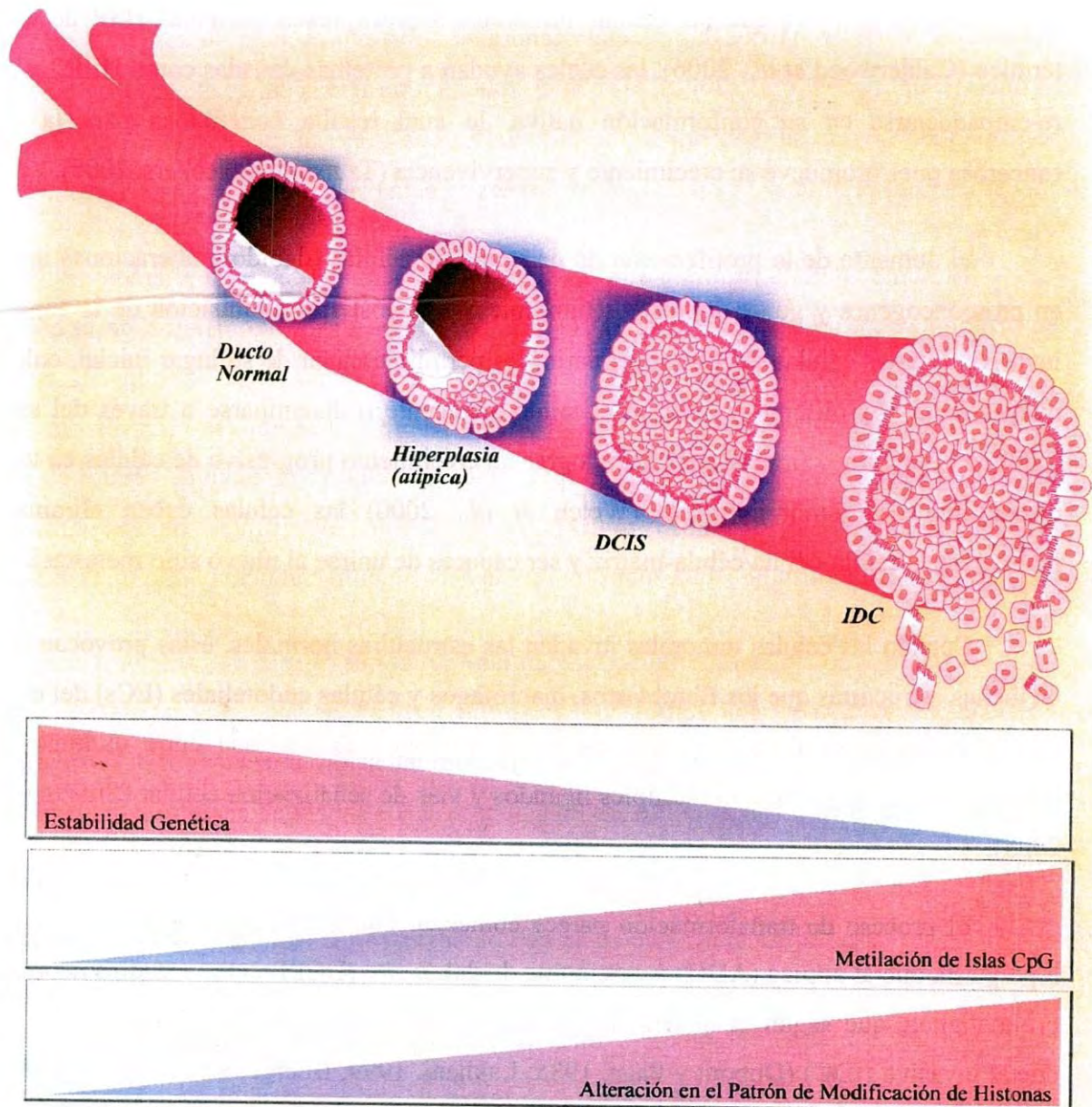


Figura 8. Modelo lineal de múltiples pasos de la progresión del cáncer de mama humano. Con base en resultados moleculares, histomorfológicos y epidemiológicos (Burstein *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2005; Moulis y Sgroi, 2008).

Si bien este modelo parece indicar que todas las mujeres que presentan hiperplasia ductal atípica están condenadas a padecer en un futuro un carcinoma ductal invasivo, los datos epidemiológicos demostraron que ésto no ocurre así, pues no toda mujer que ha presentado

hiperplasia ductal atípica ha sido diagnosticada subsecuentemente con DCIS y posteriormente con IDC. De manera análoga, se ha presentado evidencia de que no todos los cánceres de mama grado I progresan a grado III (Royslance *et al.*, 1999). Por lo que sería factible suponer que los tumores cuentan con una programación que define su grado de progresión.

La teoría clonal maneja que la iniciación del tumor es debida a eventos de transformación (genética y epigenética) en una sola célula, así como que la expansión clonal y selección de los cambios genéticos adicionales acumulados durante su progresión derivan en la malignidad del tumor. Pero hasta el momento no se ha podido realizar un perfil genético que corresponda a cada estadio tumorogénico (Chin *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006), surgiendo la hipótesis de que sólo aquellas células que acumulen las alteraciones suficientes para progresar hasta el estadio neoplásico maligno encajaran en dicho modelo, suposición sustentada por estudios basados en hibridación genómica comparativa (CGH) e índices de expresión genética generados de ADH, DCIS e IDC (Moulis y SgROI, 2008; Fackler *et al.*, 2009; Reinholz *et al.*, 2005).

Moulis y SgROI (2008) revisaron un modelo modificado de progresión del cáncer de mama tomando en cuenta dichos estudios y dividieron los DCIS en tres categorías: DCIS de bajo, intermedio y alto grado. Los tumores de bajo grado expresan un conjunto único de genes que es raramente visto en tumores de alto grado, y viceversa, y debido a este patrón son clasificados dentro de diferentes vías; por otro lado los tumores de grado intermedio expresan el panel de genes ya sea de tumores de bajo o alto grado y son divididos dentro de cada vía de acuerdo al patrón de alteración genética que incluye ganancia de 1q (brazo largo del cromosoma 1) y pérdida de 16q (brazo largo del cromosoma 16). Ésto sugiere que no todos los DCIS son iguales, que DCIS tempranos y tardíos son programados de manera diferente y que utilizando el modelo correcto es factible la detección de aquellos DCIS que cuentan con el potencial de progresar a IDC (Fackler *et al.*, 2009; Reinholz *et al.*, 2005).

Recientemente, en el laboratorio de la Dra. Saraswati Sukumar, en Johns Hopkins University (com. pers.) se realizó un análisis de metilación del DNA por microarreglos, con el fin de encontrar que cambios distinguen el fenotipo maligno, que progresará a IDC, del benigno. En ese trabajo preliminar se analizaron muestras de tejido congelado de 11 pacientes

con cáncer de mama, mismas que fueron microdisectadas, resultando en 22 muestras de tejidos con diferente composición celular: 2 DCIS puro, 7 DCIS progresivo con IDC adyacente, 7 IDC y 6 muestras de epitelio normal adyacente.

El metiloma (conjunto de modificaciones químicas en la metilación del DNA) de las 22 muestras microdisectadas fue analizado por microarreglos usando la plataforma Illumina Infinium 27G. Para la selección de los genes candidatos, se filtraron aquéllos que en DCIS progresivo presentaban una metilación cinco veces mayor a la de DCIS puro. Se encontró que entre muchos otros genes, *PITX3* y *AQP3* se encontraban no-metilados en DCIS puro, pero metilados en DCIS progresivo e IDC. Con base en sus resultados el equipo de trabajo formuló la hipótesis de que la metilación en *PITX3* y *AQP3* podría ocurrir de manera selectiva en los DCIS que pueden progresar a tumores invasivos y en tumores primarios que tienen el potencial de metastatizar en un futuro (Sukumar, 2009).

A la fecha, es ampliamente aceptado que las interacciones entre las células cancerosas y su microambiente son cruciales en la decisión de si las células cancerosas permanecen en el seno, invaden nuevos tejidos o desaparecen completamente. El microambiente que rodea al tumor está compuesto principalmente por fibroblastos, células endoteliales (ECs) y macrófagos, los cuales liberan numerosas moléculas como factores de crecimiento, proteasas, quemoquinas, moléculas que degradan la matriz extracelular (ECM) y metaloproteinasas de matriz (MMPs), que aparentemente ayudan a las células tumorales a degradar la membrana basal, en un proceso en el cual las células cancerosas condicionan al microambiente haciéndolo su cómplice en su progresión hasta metástasis (Micke y Ostman, 2004; Kalluri y Zeisberg, 2006; Mareel y Madani, 2006; Orimo y Weinberg, 2006).

Algunos de los cambios microambientales en tumores parecen ser permanentes, ya que células estromales normales asociadas a tumores mantienen sus diferencias incluso después de su remoción y cultivo *in vitro* (Orimo *et al.*, 2005; Tlsty y Hein, 2001) incrementando la posibilidad de alteraciones heredables como modificaciones epigenéticas (ejem. metilación del DNA y cambios en la cromatina). La metilación diferencial de genes de los tipos celulares mamarios entre tejido normal y cáncer encontrada por Hu y colaboradores (2005) demostró

que las alteraciones epigenéticas podrían ser en parte responsables de los cambios en el microambiente del tumor.

Al analizar el microambiente de los DCIS se reveló que los fibroblastos que los rodean no son fenotípicamente normales (Allinen *et al.*, 2004), mientras que los fibroblastos normales se activan con el fin de reparar heridas, incrementando su proliferación y migrando hacia las áreas de daño gracias a la producción de α -SMA, y tras cumplir su función cambian su fenotipo a inactivo; los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) presentan una actividad perpetua, sin ser revertido a su fenotipo normal o sufrir apoptosis y también expresan α -SMA (Li *et al.*, 2007b).

A medida que el tumor progresa también recluta fibroblastos hacia el microambiente, uno de los mecanismos involucra la expresión del factor de transformación del crecimiento beta (TGF- β) (Micke y Ostman, 2004; Bhowmick *et al.*, 2004; Kuperwasser *et al.*, 2004). Las nuevas células (ahora CAFs) adquieren un fenotipo activo contribuyendo a la tumorigénesis y metástasis (Beacham y Cukierman, 2005) y a la vez que expresan MMPs que actúan para hidrolizar proteínas extracelulares del tejido circundante el cual incluye colágeno, laminina, elastina, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina (Sternlicht y Werb, 2001; Boire *et al.*, 2005), así como una variedad de receptores de superficie celular, y moléculas de adhesión de la matriz celular (Coussens *et al.*, 2002), asistiendo en la progresión del cáncer y permitiendo la invasión y dispersión de células cancerosas.

Considerando que el criterio de diagnóstico que distingue al carcinoma invasivo del carcinoma *in situ* es la dispersión de la entidad organizada mioepitelial que rodea a las células luminales (Lerwill, 2004), surgió la hipótesis de que los fibroblastos podrían regular la progresión del carcinoma *in situ* a invasivo (Barsky y Karlin, 2005; Barsky, 2003; Polyak y Hu, 2005).

Una explicación alternativa de la observación histopatológica es que la diferenciación de las células madre a mioepiteliales se pierda progresivamente durante la tumorigénesis, resultando en la desaparición de la capa mioepitelial y la progresión maligna del tumor, ya que se ha reportado que la co-inyección de células madre de fibroblastos o mesenquima promueve

el crecimiento y metástasis de tumores malignos en modelos murinos (Zhu *et al.*, 2006; Karnoub *et al.*, 2007).

Los tumores malignos, incluyendo a los de mama, requieren la formación de un complejo de red vascular para satisfacer las necesidades nutricionales y metabólicas del crecimiento. VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) es el factor principal involucrado en la formación de vasos sanguíneos. Este factor es secretado por las células tumorales, fibroblastos y macrófagos y es responsable del interruptor angiogénico donde se forma nueva vascularización para administrar nutrientes al tumor. Los vasos sanguíneos formados en el tumor como resultado de VEGF son anormales; no están uniformemente distribuidos, presentan formas irregulares y ramificaciones tortuosas inapropiadas (Carmeliet, 2005; Dvorak, 2005; Krtolica y Campisi, 2002; Liu y Hornsby, 2007). El endotelio tumoral podría no estar sujeto a las restricciones fisiológicas que normalmente limitan a la angiogénesis, probablemente mediante silenciamiento epigenético de los genes supresores tumorales responsables de detener la angiogénesis (*clusterina*, *fibrina 1*, y *quiescina Q6*) (Hellebrekers *et al.*, 2006; Hellebrekers *et al.*, 2007b; Kim *et al.*, 2001). Para una amplia revisión consultar las publicaciones: Adams y Alitalo, 2007; Liao y Johnson, 2007; Shaked y Kerbel, 2007; Shchors y Evan, 2007.

La interacción más notable entre el endotelio y el tumor tiene lugar durante la angiogénesis. Las ECs quiescentes se vuelven activas y migran a áreas de neo-vascularización. Estas células liberan MMPs, específicamente MT1-MMP, con el fin de degradar la membrana basal y permitir el movimiento celular (Genis *et al.*, 2006), ayudando de esta manera a las células cancerosas a invadir el tejido circundante.

Otra interacción crítica, posiblemente no menos importante, es la invasión hacia vasos sanguíneos y nódulos linfáticos (transvasación) (Bockhorn *et al.*, 2007; Condeelis y Pollard, 2006; Wong y Hynes, 2006), así como la salida de las células cancerosas de la circulación conocida como migración transendotelial (Deryugina y Quigley, 2006; Heyder *et al.*, 2006; Houle y Huot, 2006).

Se ha sugerido que las células cancerosas liberadas hacia la sangre a partir de tumores primarios no metastásicos llegan al futuro sitio metastásico pero no puede establecerse. Dichas células, sin embargo, modifican el microambiente de dicho sitio haciéndolo propicio para su colonización por subsecuentes células liberadas. Al parecer los tumores malignos inducen la secreción de proteínas ECM en los fibroblastos residentes, que al unirse a las integrinas de las propias células cancerosas facilitan su anclaje (Bidard *et al.*, 2007). Recientemente se encontró que la proteína pleiotropina adecua al microambiente, incrementando la secreción de proteoglicanos y elastina de los fibroblastos residentes en el sitio de metástasis (Chang *et al.*, 2007).

Sólo el 0.1% de las células que se desprenden de un tumor y pasan a la circulación dan lugar a tumores secundarios, lo que hace a la metástasis un proceso altamente ineficiente (Welch DR y LL., 1998). La cuestión de cómo selecciona el tumor maligno un cierto órgano para servirse de él como sitio metastásico en un futuro, permanece sin ser contestada. Sin embargo, se ha observado que el cáncer de mama metastatiza con preferencia a los huesos, pulmón, cerebro, hígado y sólo raramente en otros sitios (Martínez-Montañez y Mainero-Ratchelous, 2004; Imaginis, 2009).

Kang y colaboradores encontraron que los tumores que metastatizan a hueso sobreexpresan CXCR4 (Kang *et al.*, 2003; Nguyen y Massague, 2007), cuyo ligando, la proteína SDF-1, es secretada por la médula ósea. Minn y colaboradores (2005a) descubrieron que los tumores que metastatizan a pulmón tienen niveles elevados de CXCL1, MMP1, MMP2, IL-13Ra2, VCAM1 y secretan proteína ácida rica en cisteína (SPARC) (Nguyen y Massague, 2007).

Si bien en épocas recientes se ha logrado aclarar el panorama del cáncer y su progresión, las investigaciones en este campo continúan.

2.7 Heterogeneidad del Cáncer de Mama

Los tumores malignos, entre ellos el cáncer de mama, han sido ampliamente reconocidos desde hace más de tres décadas por su heterogeneidad en parámetros medibles como la morfología, tamaño, patrón de expresión de genes, resistencia a fármacos y potencial metastásico (Perou *et al.*, 2000; Sorlie, 2004; Carter, 1978; Langley y Fidler, 2007; Macaluso *et al.*, 2003).

Las complejas vías moleculares de dicha heterogeneidad involucran componentes genéticos, epigenéticos y microambientales. Es ampliamente aceptado que la inestabilidad genética de los tumores puede ser ocasionada dentro de la misma célula tumoral por mutaciones o alteraciones epigenéticas, mediante metilación del DNA y modificación de histonas, o inducidos por su microambiente (Jackson y Loeb, 2001; Baylin y Ohm, 2006).

Los carcinomas de mama son histológicamente clasificandos en: carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante (o invasivo), carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular infiltrante (o invasivo) y carcinoma inflamatorio entre otros subtipos raros (Ahearne P.M. *et al.*, 2000). Las células cancerosas también son fenotípicamente heterogéneas y sólo una pequeña porción forman clones *in vitro* e *in vivo* (Hamburger y Salmon, 1977; Fidler y Kripke, 1977; Fidler y Hart, 1982; Heppner, 1984; Weisenthal y Lippman, 1985), pues se ha encontrado que sólo una en 5000 células cancerosas de pulmón, ovario y neuroblastoma puede formar colonias en agar blando (Hamburger y Salmon, 1977) y se requiere del trasplante de un gran número de células para la formación de tumores en modelos murinos (Masters, 2000). Dichas observaciones pueden explicarse ya sea porque (1) cada célula sea capaz de proliferar y tenga la habilidad de formar nuevos tumores, pero con una probabilidad pequeña de completar todos los pasos necesarios; o (2) que por el contrario, un subconjunto de células fenotípicamente distintas -aunque raras en número- proliferan significativamente de manera muy eficiente y tienen la capacidad de formar un nuevo tumor. Recientes investigaciones parecen apoyar esta última hipótesis (Reya *et al.*, 2001; Al-Hajj *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005).

Desde que DeOme y colaboradores (1959) sugirieran la existencia de células madre adultas, tras observar que fragmentos de tejido de epitelio aislado de varias regiones diferentes de la glándula mamaria eran capaces de reconstruir un árbol ductal mamario completo, se han propuesto dos modelos que explican la heterogeneidad de tumores, originados de una sola célula que adquirió mutaciones múltiples y potencial de proliferación ilimitado, por diferentes mecanismos: ya sea como un programa de diferenciación aberrante o como una competición entre células tumorales con diferentes fenotipos (Figura 9). Estos dos modelos no tienen por qué ser mutuamente excluyentes y su combinación (ej. evolución clonal de células madre) es una posibilidad (Polyak, 2007).

En base en la hipótesis de células madre, las células cancerosas diferenciadas son la progeñe de células madre cancerosas y no pueden sufrir división celular para auto-renovarse. De este modo, sólo las células madre cancerosas pueden acumular cambios genéticos adicionales que pueden dirigir la progresión del tumor y la resistencia a fármacos (Figura 9a). Por otra parte, en el modelo de evolución clonal, los fenotipos de células tumorales están determinados con base a la combinación de tipos de células originales que iniciaron el tumor, adquiriendo alteraciones tanto genéticas y epigenéticas, como señales paracrinas. Los fenotipos celulares en este modelo no son estables y pueden cambiar a medida que el tumor evoluciona. Además, todas las células tumorales tienen la capacidad de sufrir división auto-renovable; así, todas tienen el potencial para contribuir a la progresión del tumor y a la resistencia a fármacos (Figura 9b).

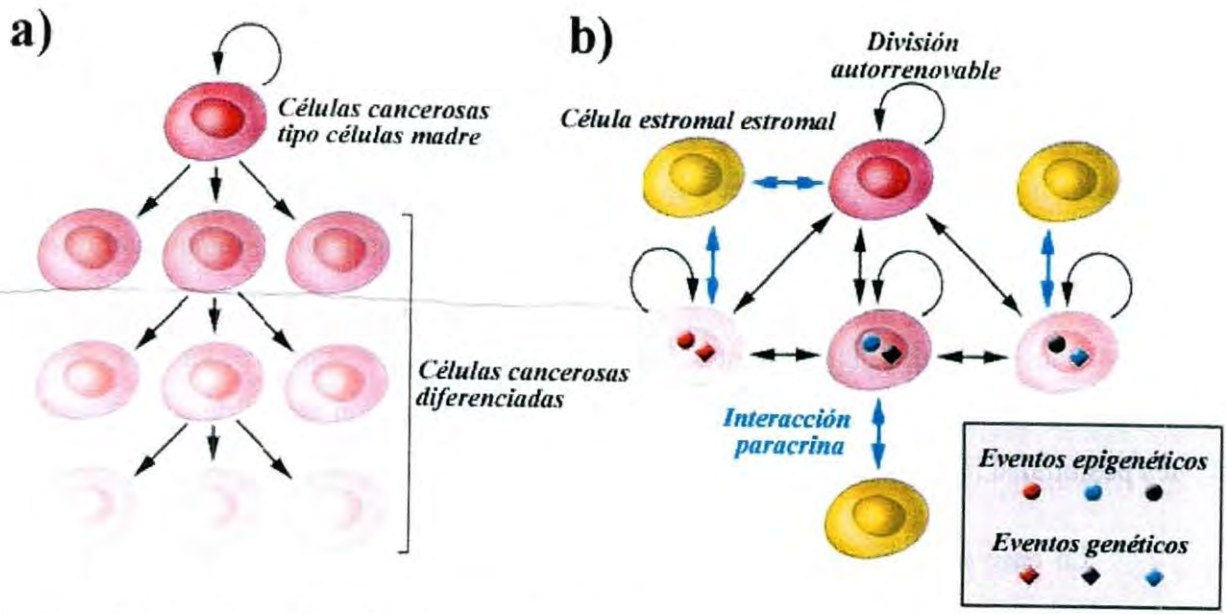


Figura 9. Modelos hipotéticos que explican la heterogeneidad intratumoral y evolución tumoral.
 Fuente: Polyak, 2007.

Se ha sugerido que las células madre de cáncer podrían originarse de dos maneras (Figura 10). En la primera, mutaciones oncogénicas en células madre normales podrían causar alteraciones en el mecanismo que restringe la expansión en células madre normales, tal como células madre dependientes en los nichos (ya sea por expansión del nicho en si (Figura 10b) o por adquisición de independencia de las señales del nicho Figura 10a). En la segunda situación, mutaciones oncogénicas le permiten a las células en tránsito continuar proliferando sin entrar en el estadio pos-mitótico de diferenciación (Figura 10c), permitiendo por tanto la activación aberrante del mecanismo auto-renovable de las células madre (Clarke y Fuller, 2006).

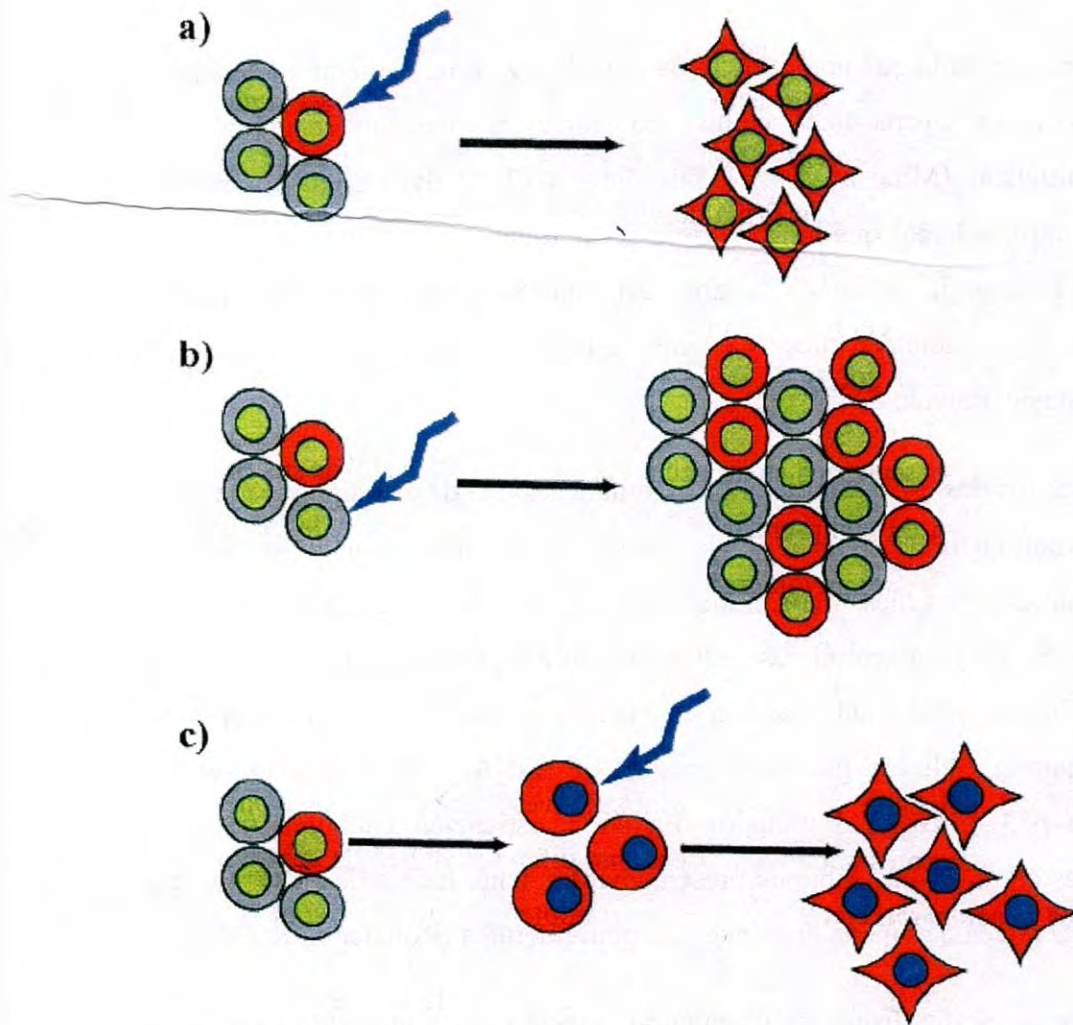


Figura 10. Orígenes de las células madre de cáncer.
Fuente: Cariati y Purushotham, 2008.

En el supuesto de que la proliferación en el tejido la glándula mamaria esté jerárquicamente organizada con un pequeño número de células madre que se dividen lentamente y un número mayor de células en tránsito de más rápida proliferación, es importante aclarar que no existen pruebas contundentes de que las células cancerosas tipo células madre sean las mismas células madre presentes en la glándula mamaria normal (Cariati y Purushotham, 2008).

Por otro lado, no hay que descartar la posibilidad de que la progresión del tumor sea el resultado de cambios genéticos y epigenéticos inestables en un ambiente siempre cambiante, entre las células cancerosas que fueron seleccionadas por evolución y expansión clonal a través del tiempo de los tumores de comportamiento más agresivo (Merlo *et al.*, 2006). Sin

embargo, hay que tener en cuenta que una sola célula clonal es extremadamente ineficiente y las células derivadas de la misma línea celular de cáncer no parecen ser igualmente tumorigénicas o metastáticas (Minn *et al.*, 2005b; Minn *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2007a). Además, este modelo explicaría por qué la firma de expresión genética de tumores primarios es capaz de predecir el riesgo de metástasis distante, así como el por qué no ha sido posible definir una firma para cada estadio del tumor y eventos genéticos subyacentes a la invasión y propagación por metástasis (Polyak, 2007).

En cualquiera de los dos escenarios es un hecho la necesidad de estudiar sus múltiples alteraciones genéticas con el fin de comprender la heterogeneidad molecular de los tumores malignos y el gran número de genes involucrados en el control del crecimiento, muerte y diferenciación celular. Sorlie y colaboradores (2001) fueron los primeros en clasificar a los tumores malignos en cinco diferentes subtipos con base en la variación del patrón de expresión genética de 78 carcinomas analizada por microarreglos de cDNA y correlacionada con el estado de la proteína p53 (silvestre o mutado). En su investigación encontraron que al clasificar estos tumores en diferentes subtipos presentaban diferente índice de supervivencia, que estudios posteriores relacionaron con la respuesta a quimioterapia (Rouzier *et al.*, 2005).

La clasificación de Sorlie distinguía un subtipo parecido al de las células normales, luminal A y B, otro positivo al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2+) y un subtipo tipo basal que expresa genes característicos de células epiteliales basales o mioepiteliales de seno normal (Sorlie *et al.*, 2001; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003; Sorlie, 2009; Banerjee *et al.*, 2006) (Figura 2).

De estos cinco subtipos, los tumores luminales en general son los de mejor pronóstico (el subtipo A en específico) (Sorlie *et al.*, 2001); los HER2 presentan un pronóstico muy pobre que de no ser por la eficiencia del tratamiento con trastuzumab (anticuerpo monoclonal anti-HER2) en pacientes HER2/neu-positivos serían los más peligrosos para la vida (Romond *et al.*, 2005); los tipo basales que no expresan ER o HER2 son los de peor pronóstico, aún cuando se ha encontrado que responden al tratamiento quimioterapéutico (Rouzier *et al.*, 2005).

Posteriormente, Haffty y colaboradores (2006) validaron el uso clínico de los marcadores tumorales ER, PR y HER2/neu para identificar al subtipo tipo-basal con un fenotipo triple negativo (TNP: respuesta negativa a los tres marcadores inmunohistoquímicos antes citados). Posteriormente Cheang y colaboradores (2008) propusieron agregar al panel de marcadores la sobreexpresión de EGFR y citoqueratina 5/6 para identificar al subtipo tipo-basal tras observar que al restringir dicho subtipo, el fenotipo ER/PR/HER2-negativo y EGFR/Citoqueratina 5/6-positivo presentaba un índice de supervivencia peor al del fenotipo negativo para los cinco marcadores (llamado 5NP), con una p de 4.05×10^{-23} , y similar al del subtipo HER2+ ($p > 0.05$) (Figura 11) (Cheang *et al.*, 2008).

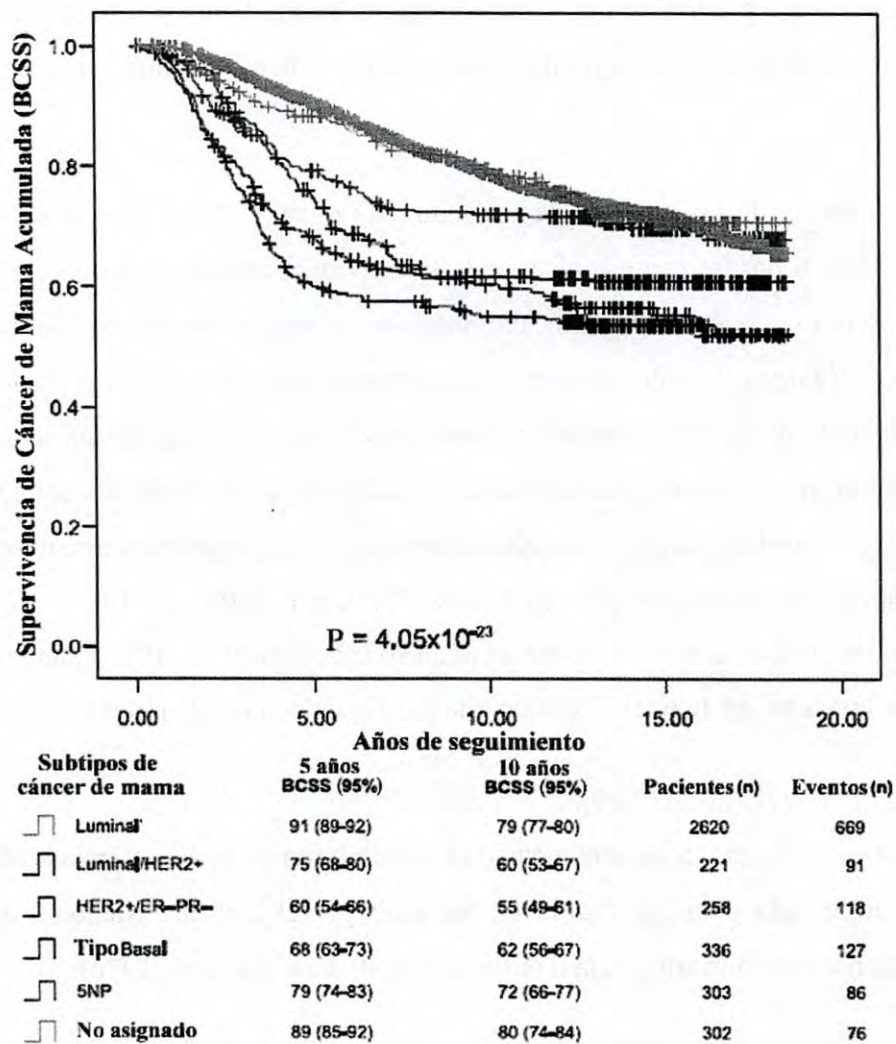


Figura 11. Subtipos de cáncer de mama según su estatus de marcadores inmunohistoquímicos. Fuente: Cheang *et al.*, 2008.

Esta última clasificación ha resultado útil para tratar la heterogeneidad del cáncer de mama y en el futuro, cuando se incluyan las alteraciones epigenéticas al estudio de heterogeneidad, seguramente se encontrarán nuevos marcadores para los subtipos de cáncer de mama establecidos.

2.8 Detección Temprana del Cáncer Mamario

a) Diagnóstico del Cáncer de Mama

Uno de las principales metas de los sistemas de salud pública para reducir el índice de mortalidad del cáncer de mama es su detección temprana. Con éste fin se realizan pruebas de escrutinio en la población susceptible como exámenes físicos, ultrasonidos y mastografías (o mamografías).

La primera de las pruebas de escrutinio, el examen físico, puede ser realizada por la misma paciente o por un profesionista de la salud y básicamente se buscan masas y/o nódulos palpables, protuberancias en el seno, enrojecimiento, retracción mínima del pezón y/o edema ligero. Las descargas ductales son un síntoma importante para acudir a un oncólogo clínico, que ante la duda de la presencia de un tumor debe ordenar la realización de una mastografía. El ultrasonido, por su parte, puede ayudar a la identificación de masas sólidas; sin embargo, éste no tiene valor diagnóstico y también deberá ser corroborado con una mastografía, por ser ésta el método de escrutinio por excelencia (Giuliano, 2006). El uso de la mastografía se remonta a finales de los años 60 (Strax *et al.*, 1967; Baines *et al.*, 1986; Shapiro *et al.*, 1966) y el método consiste en una exploración diagnóstica de imagen por rayos X de la glándula mamaria.

La edad a la que debe comenzarse el seguimiento no se ha estandarizado pues depende del historial de cada paciente (Tabla 1). Sin embargo el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) recomienda hacerse la mastografía a partir de los 40 años (Nowell, 1976).

En el caso de México, existe la Norma Oficial Mexicana NOM – 041-SSA2-2002, que es una herramienta legal publicada en septiembre del 2003, que estableció criterios de operación para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia

epidemiológica del cáncer de mama. La Norma reconoce tres tipos de intervenciones específicas que van dirigidas a la población femenina de acuerdo con su grupo de edad y su vulnerabilidad: la autoexploración, el examen clínico y la mastografía. Esta última intervención debe llevarse a cabo cada uno o dos años en mujeres de 40 a 49 años con dos o más factores de riesgo y en forma anual a toda mujer de 50 años o más, siempre que exista el recurso. Además, se recomienda la autoexploración mensual a partir de la menarquia y se señala que es responsabilidad del médico y de la enfermera (del módulo o del consultorio), realizar un examen clínico de las mamas en forma anual a las mujeres mayores de 25 años que asisten a las unidades de salud (7.2.4 de la NOM-041-SSA2-2002: Secretaría de Salud, 2003).

Tabla 1. Recomendaciones para la detección y prevención del cáncer de mama en EEUU.

Intervención	Mujeres de riesgo promedio	Mujeres de alto riesgo
Escrutinio	Mamografía anual, comenzando a la edad de 40 (Nowell, 1976, AAFP, 2002)	En portadoras de mutaciones BRCA: examen mensual comenzando entre los 18 y 21 años, y examen clínico y mastografía anual comenzando entre los 25 y 35 años (Burke <i>et al.</i> , 1997).
Quimioterapia preventiva	Ninguna (Anónimo, 2002)	Mujeres de alto riesgo según el modelo Gail y bajo riesgo de complicaciones: es posible administrar tamoxifeno (Anónimo, 2002).
Tratamiento profiláctico	Ninguno	Mujeres con ≥ 2 parientes directos con cáncer ovárico: se puede ofrecer ooforectomía tras parto o a la edad de 35 (NIH, 1995).

La sensibilidad de la mastografía depende de varios factores, como la densidad del seno, tamaño del tumor, localización y aspecto mastográfico. A medida que la densidad del seno disminuye la sensibilidad de la prueba aumenta, siendo la variabilidad de la sensibilidad en mujeres menores de 50 años del 30-40%. Otra dificultad la conforman los tumores pequeños, en particular aquellos que no presentan calcificaciones (Berg *et al.*, 2004; Giuliano, 2006).

Tras la confirmación mamográfica o física de la presencia de un tumor la paciente debe someterse a una biopsia, que confirmará o no el diagnóstico de cáncer de mama. En todos los casos es necesaria una exploración radiográfica de tórax y gammagrama óseo en busca de metástasis, pero ésta deberá ser más exhaustiva si existen ganglios linfáticos positivos. En tal caso deberá realizarse además una tomografía computarizada de hígado y de encéfalo (Giuliano, 2006).

i) Biopsia

El tratamiento nunca debe establecerse sin que un patólogo realice un examen histológico o citológico, y en algunos casos un estudio molecular, de los especímenes de biopsia de todas las masas sospechosas que se encuentren por examen físico y/o mastografía. La falibilidad del criterio clínico hace necesario este diagnóstico inequívoco de cáncer de mama (Giuliano, 2006).

El método más confiable para la obtención de biopsia es la biopsia abierta bajo anestesia local (escisional o incisional), como un procedimiento separado previo a recibir tratamiento definitivo. El más simple es la biopsia con aguja, ya sea mediante aspiración de células tumorales (BAAF) u obteniendo una pequeña porción central de tejido con una aguja cóncava. La biopsia por aspiración con aguja fina o BAAF es ampliamente usada pues ofrece un procedimiento rápido y a menor costo, pero cuando no es diagnóstica debe ser continuada por biopsia con escisión quirúrgica (Dennison *et al.*, 2003). Su principal desventaja es que no puede discernir entre DCIS e IDC (Bibbo *et al.*, 1988) y no ha demostrado ser confiable como herramienta de diagnóstico para mujeres jóvenes, menores de 35 años (Somani *et al.*, 2008).

Quizá la técnica más novedosa sea mediante la aguja dirigida por guía estereotáctica computarizada. Estas unidades se han integrado a los mamógrafos con el fin de localizar anomalías y efectuar biopsias con aguja sin necesidad de cirugía (Giuliano, 2006).

En la actualidad, bajo circunstancias muy sospechosas donde los estudios clínicos han sugerido malignidad o que se cuenta con un resultado citológico sospechoso, es posible que el cirujano realice tanto la biopsia como la cirugía en un sólo paso, en lo que se conoce como

transoperatorio. Sin embargo, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) recomienda que el procedimiento se realice en dos pasos, para que las pacientes pueden disponer de tiempo para ajustarse al diagnóstico de cáncer, considerar con cuidado las alternativas de tratamiento y buscar una segunda opinión si así lo desean (Giuliano, 2006).

ii) Metodología auxiliar

En los casos en que las pacientes presentan descargas por el pezón (PND) es posible realizar una ductoscopia (Giuliano, 2006).

La endoscopia mamaria (ductoscopia) se introdujo por primera vez en 1988 en Japón para la evaluación de pacientes con PND, y actualmente es usada para mejorar la localización de lesiones en pacientes con PND, además de permitir la recuperación de células con el propósito de diagnóstico (Moncrief *et al.*, 2005; Sauter *et al.*, 2004; Valdes *et al.*, 2006; Dooley *et al.*, 2004). De momento, la técnica es usada ampliamente para detectar papilomas y aún es necesaria una escisión quirúrgica para el diagnóstico definitivo de cáncer, ya que presenta la desventaja de no distinguir entre crecimiento benigno y maligno (Liu *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2001; Okazaki *et al.*, 1991). En cualquier caso, el cuidado estándar actual es extirpar por completo todos los papilomas debido a que se han asociado a malignidad (Harjit *et al.*, 2006).

Adicionalmente se han usado lavados ductales, una técnica que irriga cada uno de los sistemas de los conductos con solución salina y desprende células epiteliales para su estudio citológico, lo cual al parecer ha sido poco valioso (Giuliano, 2006).

b) Estudios *in vitro*

Por cuestiones éticas los investigadores se han visto obligados a utilizar modelos *in vitro* como primer acercamiento en la búsqueda de nuevos métodos de detección del cáncer de mama.

El descubrimiento a mediados de los 90s de que las células humanas podían ser cultivadas dotó a los científicos de una alternativa al uso de embriones y animales de laboratorio. Los cultivos celulares, los cuales se derivan de células obtenidas a partir del tejido original disgregadas mediante enzimas o medios químicos, proveen un gran número de material de trabajo, facilitan el control de contaminación usando antibióticos y equipo de reflujo de aire limpio, y ayudan a reducir el uso de experimentos animales (Freshney, 2000).

Los experimentos con células de tumores primarios son costosos y difíciles de controlar debido al pequeño tamaño de la muestra y a la naturaleza heterogénea de la composición celular, genética y epigenética entre las muestras tisulares de diferentes pacientes. Algunas células cancerosas removidas del tejido continuarán creciendo en las condiciones adecuadas si se suplementa el cultivo con los nutrientes apropiados. Mientras que las células normales dependen de señales de crecimiento cuando se propagan en cultivos celulares, las células tumorales muestran una dependencia gradualmente reducida de estimulación de crecimiento exógena (Hanahan y Weinberg, 2000).

Cuando se lleva a cabo el cultivo celular en el laboratorio éste se realiza *in vitro* (en vidrio), opuestamente a *in vivo* (en vivo). El proceso de cultivo le permite a las células comportarse como unidades dependientes parecidas a microorganismos. En estos cultivos, las células se dividen de manera clonal constituyendo una población genéticamente idéntica que continúa en división dentro de la placa de cultivo hasta que son limitadas debido a su potencial finito de replicación (Hayflick, 1997) o por cambios como la reducción de nutrientes en el cultivo.

Los cultivos celulares pueden realizarse como cultivos primarios, donde las células se obtienen directamente del tumor primario (de esta manera fueron aisladas algunas de las líneas celulares actuales) o del seno normal (con el fin de aislar células epiteliales mamarias: HMEC). En este tipo de cultivos las primeras células en cultivo son de naturaleza heterogénea y tras varios pases a placas con medio de cultivo fresco, la célula morirá o se convertirá en una línea celular continua. Estas líneas celulares presentan varias alteraciones diferentes a las del tumor primario como consecuencia de la adquisición reciente de la capacidad de crecer en cultivo, pero retienen muchas de sus propiedades fenotípicas y genotípicas tras varios pases

(Lacroix y Leclercq, 2004; Wistuba *et al.*, 1998) y pueden ser utilizadas en modelos *in vitro* para simular las condiciones que tendrían las células en el organismo del que fueron aisladas (Neve *et al.*, 2006; Charafe-Jauffret *et al.*, 2006).

Con el fin de resolver los problemas asociados con conseguir y usar tejido humano primario, se han desarrollado diversas líneas celulares de cáncer de mama a partir de varias fuentes, incluyendo efusión pleural (ej. MDAMB231 y MCF7), cánceres de mama primarios (ej. SUM149 y SUM159), recurrencia de tumores primarios (ej. SUM225), e incluso nódulos metastásicos (ej. SUM1315) (Neve *et al.*, 2006; Lacroix y Leclercq, 2004). Aún cuando el uso de líneas celulares tiene sus limitaciones, su uso está considerado como el mejor medio para estudiar al cáncer de mama tanto desde el aspecto básico como clínico, debido a que las diferencias fenotípicas y funcionales entre células que inician los tumores mamarios humanos (células madre cancerosas) y esos que comprenden la masa tumoral son difíciles de estudiar utilizando sólo tejido tumoral primario (Fillmore y Kuperwasser, 2008).

Además, las líneas celulares de cáncer de mama pueden ser usadas para recapitular la histología, progresión y propagación del tumor al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes (Kuperwasser *et al.*, 2005; Sheridan *et al.*, 2006; Kuperwasser *et al.*, 2004). Sin embargo, tras haber sido cultivadas *in vitro* por largo tiempo, las células cancerosas pierden la característica dinámica de regenerar tejido (Clarke *et al.*, 2006).

Gracias al uso de los cultivos celulares se han descubierto y se seguirán descubriendo mutaciones que dan lugar a dos clases de genes cancerosos: oncogenes con ganancia de función dominante y genes supresores tumorales con pérdida de función recesiva (Bishop, 1996). Así mismo, los cultivos celulares pueden ser utilizados como modelos para el desarrollo y ensayo de terapias novedosas (Fillmore y Kuperwasser, 2008).

c) Avances en el Diagnóstico Molecular del Cáncer de Mama

La falta de especificidad del método de escrutinio por excelencia ha creado la necesidad de otros métodos de diagnóstico para el cáncer de mama. La posibilidad de detectar las primeras manifestaciones de la enfermedad antes de ser reconocibles en un examen mastográfico o físico ha esperanzado a los científicos.

Investigaciones recientes se han dedicado al estudio de hipermetilación de regiones promotoras de genes con el fin de usarlos como herramienta de prevención, diagnóstico y monitoreo del cáncer de mama.

Evron y colaboradores (2001) fueron los primeros en demostrar que los genes hipermetilados específicos de cáncer pueden ser usados como biomarcadores para la detección temprana del cáncer de mama. Ellos utilizaron un panel de tres marcadores (*Cyclina 2*, *RARβ* y *TWIST*) y lograron detectar exitosamente células cancerosas en lavados ductales y endoscopias de mama.

Posteriormente Fackler y colaboradores (2004) mejoraron el panorama al desarrollar un método de análisis múltiple cuantitativo mediante PCR específico para metilación (“quantitative multiplex methylation-specific PCR” o QM-MSP, por sus siglas en inglés) lo suficientemente sensible como para examinar muestras clínicas de tejido embebido en parafina, donde el DNA suele encontrarse dañado por el tratamiento de fijación. Además identificaron tres marcadores (*RASSF1A*, *TWIST* y *HIN1*) que en ensayos clínicos posteriores demostraron ser más eficientes para el diagnóstico de cáncer de mama que la citología, al presentar el doble de sensibilidad en lavados ductales (Fackler *et al.*, 2006) y endoscopias (Fackler *et al.*, 2009).

Estas aportaciones prometen un método fiable para discernir entre mujeres con papilomas mamarios que deben someterse a cirugía y las que no, así como predecir la presencia de DCIS en las pacientes. El cuidado estándar cuenta con la citología para la detección de esta tumoración benigna en células cancerosas recolectadas durante la ductoscopia. Fackler y colaboradores (2009) demostraron que de los ductos con cáncer confirmado histológicamente, sólo el 29% fueron identificados por examen citológico de las células ductales, mientras que el 100% de los ductos con cáncer histológicamente comprobado fueron correctamente identificados al analizar las muestras con el panel de marcadores *RASSF1A*, *TWIST* y *HIN1* por QM-MSP.

En cuanto al diagnóstico de IDC, se ha propuesto que en algunos casos la identificación del DNA hipermetilado en especímenes de biopsias de seno de pacientes acarreadores de la mutación *BRCA1* puede ser de utilidad en los casos en que el diagnóstico patológico es incierto (Esteller *et al.*, 2001).

Además de los fluidos ductales y las secciones de tejido de biopsias, se ha propuesto que la hipermetilación de las islas CpG también puede ser detectada en el DNA circulante de la sangre (Widschwendter y Menon, 2006). Esto implicaría un gran avance en el potencial para el diagnóstico, predicción y monitoreo de recurrencias tras el tratamiento (Widschwendter y Menon, 2006; Silva *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003).

2.9 Clasificación por Etapas o Estadificación del Cáncer de Mama

La clasificación del cáncer de mama determina la extensión de la enfermedad cancerosa basada en el concepto de que el cáncer se extiende espacialmente en el cuerpo en tres niveles que son el local, regional y a distancia. El sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) provee una estrategia para agrupar pacientes con relación a su pronóstico, con base en el sistema TNM que permite clasificar a las pacientes tanto clínica como patológicamente (Tabla 2).

La *estadificación clínica* está basada en la exploración física, las radiografías, la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética nuclear, la gammagrafía y otras técnicas de imagen; mientras que la *estadificación anatomopatológica o quirúrgica* consiste en el análisis histológico de todos los tejidos extirpados durante la cirugía.

El sistema TNM describe el tamaño del tumor (T) primario, propagación a nódulos (N) linfáticos regionales y metástasis (M) distante (Tabla 2). La letra T seguida por un número que va del 0 al IV, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. La letra N seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y si estos ganglios están adheridos a otras estructuras. La letra M seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes o a ganglios linfáticos no próximos a la mama. La clasificación para los subgrupos, se realiza con números que van del I al IV (Greene, 2002).

Tabla 2. Estadificación TNM para cáncer mamario.

Tumor primario (T)	
TX	No puede determinarse la presencia de tumor primario.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i> .
Tis (LCIS)	Carcinoma lobular <i>in situ</i> .
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin lesión tumoral.

Nota: la enfermedad de Paget asociada con una lesión tumoral se clasifica de acuerdo con el tamaño del tumor.

T	Descripción	Nódulos linfáticos regionales (N)	Clínico/Patológica (pN) ²
T1	Tumor de 2 cm o menos en el sitio de dimensión mayor.		
T1mic	Microinvasión de 0.1 cm o menos en el sitio de dimensión mayor.		
T1a	Tumor mayor de 0.1 cm pero no mayor a 0.5 cm en el sitio de dimensión mayor.	NX	No se puede determinar la presencia de nódulos linfáticos regionales (p. ej. removidos previamente).
T1b	Tumor mayor de 0.5 cm pero no mayor de 1 cm en el sitio de dimensión mayor.	N0	No existe metástasis a nódulos linfáticos.
T1c	Tumor mayor de 1 cm pero no mayor de 2 cm en el sitio de dimensión mayor.	pNX	Los nódulos linfáticos regionales no pueden evaluarse (p. ej. removidos previamente o no removidos por estudio patológico).
T2	Tumor mayor de 2 cm pero no mayor de 5 cm en el sitio de dimensión mayor.	pN0	No hay evidencia histológica de metástasis a nódulos linfáticos regionales, ni examen adicional para células tumorales aisladas (CTA).
T3	Tumor mayor de 5 cm en el sitio de dimensión mayor.	pN0 (I-)	No hay evidencia histológica de metástasis nodular linfática regional, HIQ (Inmunohistoquímica) negativo
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a a) pared del tórax, o b) piel, sólo como se describe a continuación.	pN0 (I+)	No hay evidencia histológica de metástasis nodular linfática regional, HIQ positivo, conglomerado de CTA no mayor de 0.2 mm.
T4a	Extensión a la pared del tórax, no incluyendo el músculo pectoral.	pN0 (mol ⁻)	No hay evidencia histológica de metástasis nodular linfática regional, datos moleculares negativos (RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa) ³ .
T4b	Edema (incluyendo aspecto de "piel de naranja") o ulceración de la piel de la región mamaria, o nódulos satélites cutáneos confinados a la misma mama.	pN0 (mol ⁺)	No hay evidencia histológica de metástasis nodular linfática regional, datos moleculares positivos (RT-PCR) ³ .
T4c	Presencia conjunta de T4a y T4b.		
T4d	Carcinoma inflamatorio.		

Tabla 2. Estadificación TNM para cáncer mamario (continuación).

N1	Metástasis a nódulos linfáticos axilares ipsolaterales móviles.	pN1mi	Micrometástasis (mayores de 0.2 mm, ninguna mayor de 2.0 mm).
N2	Metástasis en nódulos linfáticos axilares ipsolaterales fijos, o en nódulos mamaros internos ipsolaterales aparentes clínicamente en ausencia de metástasis nodulares linfáticos de las regiones axilares clínicamente evidentes.	pN1a	Metástasis en 1 a 3 nódulos linfáticos de la región axilar.
		pN1b	Metástasis de nódulos de la región mamaria interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección de nódulo linfático centinela pero no aparente clínicamente ⁴ .
N2a	Metástasis en nódulos linfáticos axilares ipsolaterales fijos a otro o a otras estructuras.		Metástasis en 1 a 3 nódulos linfáticos de la región axilar y en nódulos de la región mamaria interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección de nódulo linfático centinela pero no aparente clínicamente ⁴ (Si se asocia con positividad a más de 3 nódulos linfáticos axilares, los nódulos de la región mamaria interna se clasifican como pN3b para reflejar el incremento de la carga tumoral).
N2b	Metástasis sólo en nódulos mamaros internos ipsolaterales aparentes clínicamente ¹ y en ausencia de metástasis nodular linfática de la región axilar evidente clínicamente.	pN1c	
N3	Metástasis en nódulos linfáticos infraclaviculares ipsolaterales con o sin afección de nódulos linfáticos axilares, o en nódulos linfáticos de la región mamaria interna ipsolateral aparentes clínicamente ¹ y en presencia de metástasis nodular linfática de la región axilar clínicamente evidente; o metástasis en nódulos linfáticos supraclaviculares ipsolaterales con o sin afección de nódulos linfáticos de la región mamaria interna o de la región axilar.	pN2	Metástasis en 4 a 9 nódulos linfáticos de la región axilar o en nódulos de la región mamaria interna aparentes clínicamente ⁴ en ausencia de metástasis de nódulos linfáticos de la región axilar.
		pN2a	Metástasis en 4 a 9 nódulos linfáticos de la región axilar (al menos un depósito tumoral mayor de 2.0 mm).
		pN2b	Metástasis en nódulos linfáticos de la región mamaria interna clínicamente aparentes ⁴ en ausencia de metástasis de nódulos linfáticos de la región axilar.
N3a	Metástasis en nódulos linfáticos infraclaviculares ipsolaterales.		Metástasis en 10 o más nódulos linfáticos, o en nódulos de la región infraclavicular, o en nódulos de la región mamaria interna ipsolateral aparentes clínicamente ⁴ en presencia de 1 o más nódulos linfáticos axilares positivos; o en más de 3 nódulos linfáticos de la región axilar con metástasis microscópica clínicamente negativa en nódulos linfáticos de la región mamaria interna; o en nódulos linfáticos supraclaviculares ipsolaterales.
N3b	Metástasis en nódulos linfáticos de la región mamaria interna ipsolateral y nódulos linfáticos de la región axilar.		
N3c	Metástasis en nódulos linfáticos supraclaviculares ipsolaterales.	pN3	
pNX	Metástasis en 1 a 3 nódulos linfáticos de la región axilar o nódulos de la región mamaria interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección de nódulo linfático centinela pero no aparente clínicamente ⁴ .		

Nota: las células tumorales aisladas (CTA) se definen como células tumorales únicas o conglomerados pequeños de células no mayores de 0.2 mm, comúnmente sólo detectadas mediante métodos de inmunohistoquímica (IHQ) o moleculares, pero que pueden verificarse mediante las tinciones de HE (Hematoxilina-Eosina). Por lo general, las CTA no muestran evidencia de actividad maligna, por ejemplo: proliferación o reacción estromal.

Tabla 2. Estadificación TNM para cáncer mamario (continuación).

		Metástasis a distancia (M)			
pN3a	Metástasis en 10 o más nódulos linfáticos de la región axilar (al menos un depósito tumoral mayor de 2.0 mm), o metástasis a los nódulos linfáticos de la región infraclavicular.	MX	No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia.		
		M0	No hay evidencia de metástasis a distancia.		
		M1	Metástasis a distancia.		
		Agrupación por etapas			
pN3b	Metástasis en nódulos linfáticos de la región mamaria interna ipsolateral aparentes clínicamente ⁴ en presencia de 1 o más nódulos linfáticos axilares positivos; o en más de 3 nódulos linfáticos axilares y en nódulos linfáticos de la región mamaria interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección de nódulo linfático centinela pero no aparente clínicamente ⁴ .	Etapa 0	Tis	N0	M0
		Etapa I	T1 ⁵	N0	M0
		Etapa IIA	T0	N1	M0
			T1 ⁵	N1	M0
		Etapa IIB	T2	N0	M0
			T2	N1	M0
		Etapa IIIA	T3	N0	M0
			T3	N1	M0
			T0	N2	M0
			T1 ⁵	N2	M0
Etapa IIIB	T2	N2	M0		
	T3	N1	M0		
	T3	N2	M0		
pN3c	Metástasis en nódulos linfáticos supraclaviculares ipsolaterales.	Etapa IIIB	T4	N0	M0
		Etapa IIIC	T4	N1	M0
			T4	N2	M0
Etapa IV	T*	N3	M0		
Etapa IV	T*	N*	M1		

Nota: la designación de la etapa puede cambiar si los estudios de imagen revelan la presencia de metástasis a distancia, suponiendo que los estudios se llevan a cabo dentro de 4 meses a partir del diagnóstico en ausencia de progresión de enfermedad y en caso de que el paciente no haya recibido tratamiento neoadyuvante.

Reproducido de American Joint committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois (Greene, 2002).

¹**Aparente clínicamente** se define como la detección mediante estudios de imagen (excluye los de linfografía por medicina nuclear) o mediante exploración física o apariencia macroscópicamente patológica.

²La clasificación se basa en la disección de nódulos linfáticos de la región axilar con o sin disección de nódulo linfático centinela. La clasificación basada sólo en la disección del nódulo linfático centinela sin disección subsecuente de nódulos linfáticos de la región axilar se designa como (nc) "nódulo centinela", por ejemplo, pN0.

³RR-PCR: transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

⁴**Aparente clínicamente** se define como la detección mediante estudios de imagen (excluye los de linfografía por medicina nuclear) o mediante exploración física.

⁵T1 incluye T1mic.

*Cualquier estadio.

2.10 Susceptibilidad o Riesgo de Contraer Cáncer de Mama

La posibilidad de predecir el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de mama ha esperanzado a los científicos, quienes en base a estudios epidemiológicos han logrado descubrir una serie de factores que aparentemente contribuyen a la formación de la neoplasia maligna o cuando menos pueden ser usados para predecir el riesgo de una persona de padecer la enfermedad.

En la tabla 3 se enlistan una serie de factores que bien pueden disminuir el riesgo de las pacientes de desarrollar cáncer de mama o incrementar la probabilidad de padecerlo y deberían evitarse siempre que sea posible, pues sólo algunos de ellos son modificables (Dumitrescu y Cotarla, 2005).

Tabla 3. Factores de riesgo para el cáncer de mama.

Factores de Riesgo para Cáncer de Mama	Magnitud del Riesgo
Edad	++
Historia familiar de cáncer de mama	++
Mutaciones en BRCA 1/2	++
Exposición a radiación	++
Historial de biopsias o tumores benignos	++
Menarquía temprana	++
Menopausia tardía	++
Partos nulos o el primero a edad avanzada	++
Mamograma con alta densidad en seno	++
Terapia de remplazo hormonal	+
Consumo reciente de anticonceptivos	+
Obesidad en mujeres posmenopáusicas	+
Consumo de alcohol (1 bebida/día)	+
Estatus socioeconómico	+
Factores que disminuyen el riesgo de cáncer de mama	
Edad temprana en el primer parto	--
Número elevado de partos	--
Lactancia prolongada	--
Obesidad en mujeres premenopáusicas	-
Actividad física	-

Fuente: Dumitrescu y Cotarla, 2005.

Entre estos factores de riesgo se destacan los no modificables como menarquia temprana, partos nulos o edad avanzada al primer parto, historial familiar de cáncer de mama, mutaciones en los genes *BRCA* e historial de biopsias debido a que los modelos de predicción propuestos hasta la fecha los usan como base.

Cuando la mujer tiene su primer periodo menstrual antes de los 12 años (menarquía temprana) el riesgo de contraer la enfermedad se incrementa probablemente por un mayor tiempo de vida expuesta a estrógenos (Gail *et al.*, 1989). Con cada ciclo menstrual aumenta la posibilidad de que se produzca algún daño en las células reguladas por este control hormonal, modificando éstas a su vez a las células proliferativas, aunque también es posible que las células proliferativas se vuelvan capaces de responder a la estimulación hormonal (Briskin, 2002; Fedi *et al.*, 1997). Algo similar podría ocurrir con la menopausia tardía.

A su vez, la edad avanzada en el primer parto o los partos nulos también incrementa el riesgo de manera importante, probablemente debido a que las células epiteliales nunca alcanzan la diferenciación o lo hacen demasiado tarde (veáse apartado de fisiología del cáncer).

Normalmente se observa que cuanto mayor es la mujer en su primer parto mayor es el riesgo, pero en los casos en los que la paciente cuenta con un historial familiar de cáncer de mama ocurre lo contrario (Gail *et al.*, 1989). Esto se debe a que el material genético se encuentra dañado (genética o epigenéticamente) por herencia y al dramático remodelamiento que sufre la glándula mamaria durante el embarazo, en el cual numerosos genes asociados con invasión y degradación de células MEC son significativamente sobreexpresados. Esto, podría contribuir a que ocurran daños adicionales en el DNA y a la subsecuente formación de células cancerosas. Estos cambios asociados al embarazo y lactancia en las células MEC podrían potencialmente explicar el peor pronóstico de los tumores de mama diagnosticados en el embarazo o poco tiempo después (Schedin, 2006; Polyak, 2006).

El historial familiar de cáncer de mama por sí mismo incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad y está relacionado con el grado de parentesco con familiares que ya han padecido la enfermedad. Sin embargo, este tipo de cáncer sólo incluye a un pequeño

porcentaje de los casos de cáncer de mama, el más grande re-análisis hasta el momento realizado con datos individuales de 52 estudios epidemiológicos reportó que el 12% de las mujeres con cáncer de mama tienen un familiar afectado y el 1% tiene dos o más (Anónimo, 2001). Además hay que considerar que aunque en algunos casos parece existir una cierta predisposición genética al desarrollo de cáncer, en realidad ésta es debida al contacto con algún cancerígeno habitual en el entorno familiar. Por lo que se recomienda el escrutinio genético de la familia en búsqueda de defectos genéticos.

Hasta el momento son dos los genes relacionados con la predisposición a padecer cáncer de mama, *BRCA1* y *BRCA2*. Cuando funcionan normalmente, ambos genes juegan un rol en la reparación del DNA y por ende protegen contra el desarrollo tumoral. Sin embargo, las mujeres con mutaciones en estos genes tienen un 56% al 87% de posibilidad de desarrollar un cáncer de mama. La alteración en estos genes se trata de mutaciones que se encuentran en todas las células del cuerpo, por lo que su detección puede realizarse a partir de una muestra de sangre o saliva (García-Foncillas, 2003).

Con el fin de discernir entre las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama que requieren el análisis genético y las que no, Berry y colaboradores desarrollaron un modelo para determinar la probabilidad que de una mujer de ser portadora de mutaciones en los genes *BRCA1* y/o *BRCA2*, dicho programa fue llamado BRCA-program o BRCA-PRO, lo que permite a las mujeres afectadas tomar decisiones importantes sobre su salud cuando todavía no presentan la enfermedad y ayuda a prevenir la innecesaria morbilidad y mortalidad de los portadores del defecto genético (Berry *et al.*, 2002).

Actualmente se realiza un ensayo clínico auspiciado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos, para detectar pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama de este tipo, utilizando como base el programa BRCA. En dicho estudio se realiza el análisis genético en busca de mutaciones en los genes *BRCA* a quien presenta una probabilidad de riesgo $\geq 10\%$ (LaMarca y Rosen, 2008). Sin embargo, el descubrimiento reciente de que la región promotora de *BRCA1* puede ser hipermetilada de manera aberrante derivando en la silencianción o pérdida de expresión del gen (Herman y Baylin, 2003) podría ampliar el

panorama en cuanto al uso de *BRCA1* para predecir el riesgo de la paciente de contraer cáncer de mama.

Por su parte, el riesgo atribuido al historial de biopsias se debe a los cambios en el seno que previos a la incisión derivaron en la sospecha del cáncer de mama, y éste aumenta si se observa hiperplasia atípica, papiloma o carcinoma *in situ* (Hennighausen y Robinson, 1998).

En 1989 se desarrolló modelo de Gail, que es el primer modelo de regresión logística diseñado para calcular el riesgo de una paciente a desarrollar cáncer de mama invasivo. Básicamente, el método evalúa el riesgo promedio en un grupo de mujeres con los mismos factores de riesgo y edad. El modelo es aplicable a mujeres mayores de 35 años y permite calcular el riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo en los próximos 5 años y en el resto de su vida (Gail *et al.*, 1989), con el fin de comenzar los tratamientos preventivos pertinentes (Fisher *et al.*, 1998; Rockhill *et al.*, 2001).

El modelo de Gail se basó en datos de casos y controles del “Proyecto de Demostración de la Detección del Cáncer de Mama” (BCDDP) y determina el riesgo relativo como el producto de las tasas de riesgo de cada una de las características utilizadas en la evaluación del riesgo, las cuales son: historial de tumores benignos (carcinoma ductal/lobular *in situ*, edad actual, historial reproductivo (edad de menarquía y edad al primer parto), historial familiar del cáncer (número de mujeres ascendentes y descendentes directos que tienen cáncer de mama), historial de biopsias (número de biopsias y presencia de hiperplasia atípica), raza o etnia (Bondy *et al.*, 1994; Spiegelman *et al.*, 1994).

El modelo ha tenido algunas modificaciones recientes, que incluyen el historial de hiperplasia atípica y la raza o etnia, pero de momento ningún factor modificable (ej. terapia hormonal, obesidad y consumo de alcohol). De hecho el NCI provee un programa amigable para predecir el riesgo que se basa en dicho modelo (<http://bcra.nci.nih.gov/brc/start.htm>). Sin embargo, parte de la información utilizada para evaluar el riesgo de mujeres hispanas se deriva del proyecto “BCDDP” donde participaron mujeres no-hispanas, lo que hace que la estimación

sea un tanto incierta. Además, el método presenta menor precisión cuando la paciente presenta historial de DCIS o IDC (Hennighausen y Robinson, 1998).

Algunos años después de que se desarrolló el modelo de Gail, Chen desarrolló un modelo más completo donde se incluye la densidad de la mama, pero el modelo de Gail continúa siendo más aceptado (Tice *et al.*, 2005; Decarli *et al.*, 2006). La principal desventaja que presenta el modelo de Chen es que la densidad de la mama no aparece en los reportes clínicos de prácticas estándar de mamografía de calidad (Chen *et al.*, 2006). Lewis y colaboradores (2005), por su parte, propusieron utilizar la hipermetilación en el promotor de dos genes (*RASSF1A* y *APC*) frecuentemente metilados en cáncer de mama como otra herramienta para medir el riesgo de padecer la enfermedad, sin embargo aún es necesario confirmar para el gen *APC* que estos cambios ocurren más temprano que las anomalías histológicas, y examinar mediante estudios de seguimiento si dichos cambios están asociados con el desarrollo subsecuente del cáncer de mama, recientemente Fackler y colaboradores demostraron que esto era así para el gen *RASSF1A* (2009).

Actualmente se está llevando a cabo el primer estudio que relacionara los subtipos de cáncer de mama de mujeres de ascendencia mexicana con algunos de los factores de riesgo asociados a la enfermedad (Anexo 2). Los resultados del estudio podrían ser utilizados en un futuro para validar un modelo que permita predecir el riesgo de desarrollar la enfermedad en la población hispana, específicamente en aquella de ascendencia mexicana.

Si bien el riesgo de las mujeres puede ser estimado con estos modelos, las predicciones son falibles y no permiten decir de forma específica quienes desarrollarán el cáncer de mama. Sin embargo ante la presencia de un alto riesgo es posible administrar un tratamiento preventivo (Giuliano, 2006; Narod *et al.*, 2002; King *et al.*, 2001), pues está bien establecido que la terapia sistemática adyuvante reduce la posibilidad de contraer cáncer de mama en mujeres con alto riesgo para carcinoma de mama (Brewster *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2001; Singletary *et al.*, 2000). Por otro lado, la manipulación hormonal, como la administración de anti-estrógenos (ej. tamoxifeno), es útil en el tratamiento del cáncer de mama y puede reducir la incidencia de cáncer de mama en mujeres de alto riesgo (Fisher *et al.*, 1998). Este

tratamiento inicial demora el comienzo del cáncer y prolonga la supervivencia tras el diagnóstico (Figura 12).

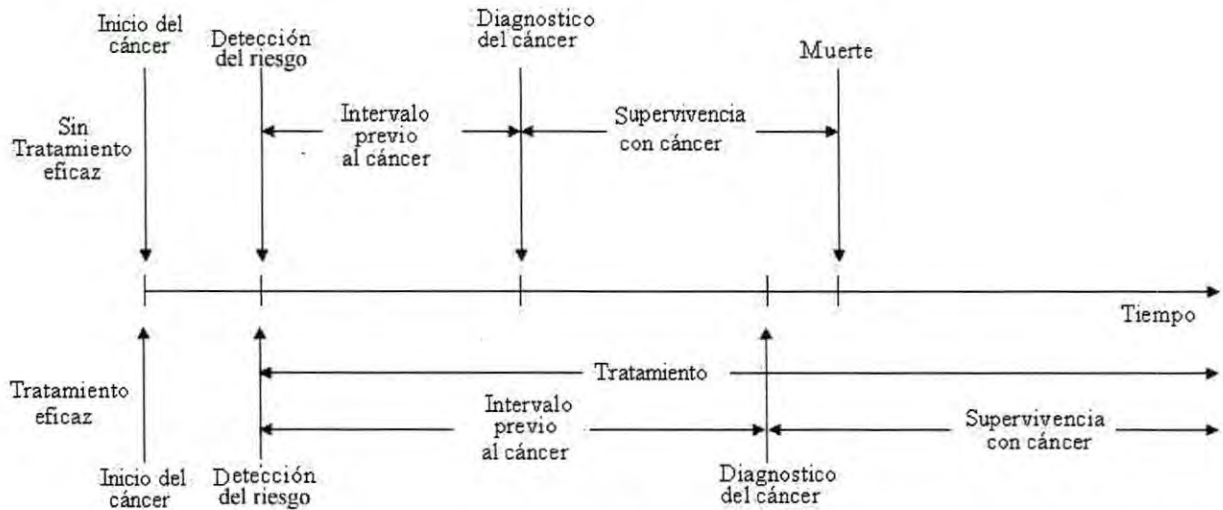


Figura 12. Comparación de la progresión clínica del cáncer de mama antes y después del tratamiento.

La detección del riesgo ha traído grandes ventajas en la interrupción del inicio o la progresión del cáncer en mujeres de alto riesgo de desarrollar cáncer de mama. Esto ha proporcionado a los oncólogos clínicos una herramienta para aconsejar a los pacientes respecto al tratamiento y malignidades secundarias, todo ello bajo la asesoría de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (Zon *et al.*, 2009).

Por su parte, la importancia de los factores de riesgo modificables radica en la posibilidad de prevenirlos y así disminuir el riesgo de contraer cáncer de mama. Este es el caso de la obesidad, pues se ha demostrado una relación entre índice de masa corporal (IMC) y riesgo de cáncer de mama para las mujeres postmenopáusicas (Friedenreich, 2001). Esto posiblemente se debe a que tras la menopausia, el tejido adiposo es la mayor fuente de estrógenos, y una mujer posmenopáusicas obesa tiene niveles mayores de estrógenos endógenos (Harris *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1997).

2.11 Factores Pronóstico y Predictivos

Por lo regular, el tratamiento de la paciente con cáncer de mama recurre a un grupo multidisciplinario, que incluye a cirujanos oncólogos, radio oncólogos, oncólogos médicos, cirujanos reconstructores, psicólogos oncólogos, patólogos y grupos de apoyo. Sin embargo, el tratamiento específico de una mujer con cáncer de mama depende en esencia del conocimiento de los factores pronóstico y predictivo, lo que se traduce en una atención individualizada (Ramírez-Ugalde *et al.*, 2003).

Es importante que el oncólogo clínico base las decisiones terapéuticas en factores pronósticos y predictivos del comportamiento y desarrollo del cáncer de mama. Entendiéndose como factor pronóstico aquel cuya medición, objetiva o subjetiva, se traduce en cambios en el periodo libre de enfermedad o supervivencia, como: estadio del tumor (tamaño del tumor, estado de los ganglios axilares y metástasis), subtipo histológico, grado histológico o nuclear, edad y estado menopáusico.

Al momento de evaluar dichos factores se presta principal interés al estado ganglionar, ya que guarda relación directa con el número de ganglios afectados, la carga metastática y la extensión extracapsular. Como se veía anteriormente en el apartado clasificación por etapas o estadificación del cáncer de mama, éstos se agrupan de acuerdo con el número de ganglios afectados (negativos, 1 a 3, y 4 o más). Para los grupos con afección ganglionar la recomendación general es administrar tratamiento sistémico, sin importar cuál sea el número de ganglios afectados, por lo que el valor de otros factores pronósticos y predictivos disminuye en este grupo de personas (Fisher *et al.*, 1993).

En el subgrupo de pacientes con ganglios negativos el tamaño tumoral representa el factor pronóstico y predictivo más importante de supervivencia y recurrencia local. La relación de supervivencia y tamaño tumoral es lineal en estos casos. El pronóstico parece deteriorarse de forma significativa con tamaños tumorales mayores de 3 cm en las variantes histológicas consideradas de mejor pronóstico. En las enfermas con variantes de pobre pronóstico el valor de corte es controversial, aunque en la actualidad se considera un tamaño

de 1 cm en el proceso de decisión. Por otro lado hasta un 30% de las mujeres con ganglios negativos sufre recaída (Ramírez-Ugalde *et al.*, 2003).

Los grados histológico y nuclear, así como los subtipos histológicos, también suministran una información adecuada acerca del pronóstico. Una de las escalas más empleadas es la de Scarff-Bloom Richardson (SBR), donde las pacientes con escalas SBR elevadas conllevan un peor pronóstico (Elston y Ellis, 1991). Por otra parte las variantes histológicas consideradas de buen pronóstico incluyen los carcinomas mucinoso, medular, cribiforme y papilar, y los carcinomas lobulares los de peor pronóstico.

La edad es sin duda otro factor pronóstico de importancia. Su influencia, aunada al estado menopáusico de las enfermas, se ha descrito en extenso. Hasta la fecha se asume que las personas menores de 35 años y premenopáusicas poseen un peor pronóstico (Ramírez-Ugalde *et al.*, 2003).

Por su lado, la medición de un factor predictivo implica una respuesta específica a un tratamiento definido, como: estado de los receptores de estrógenos, progesterona, HER2 y Ki67, y pueden ser aplicados a las decisiones terapéuticas de las enfermas con cáncer de mama.

2.12 Marcadores Tumorales

Los marcadores tumorales para cáncer de mama se han convertido en factores críticamente importantes usados de manera rutinaria para la toma de decisión en el tratamiento por su capacidad de predecir la respuesta a estrategias terapéuticas particulares, lo que puede ayudar a optimizar el cuidado individual (Esteva y Hortobagyi, 2004; Gonzalez-Angulo *et al.*, 2006). Hasta el momento, ningún marcador aislado ha probado mayor utilidad que el resumen médico o histopatológico; por ello, son necesarios múltiples marcadores tumorales para mejorar los estándares de cuidado (Love *et al.*, 2003; Ross y Fletcher, 1998b; Ross *et al.*, 2004).

Se ha observado que algunos cánceres de mama cuentan con receptores hormonales en su núcleo celular, son estimuladas a crecer por medio de señales endocrinas y responden por tanto a la represión hormonal ejercida por el fármaco tamoxifeno (Esteve y Hortobagyi, 2004) (veáse apartado terapia hormonal). Para determinar si el tumor presenta o no receptores de estrógeno y progesterona es necesario realizar una tinción inmunohistoquímica sobre tejido de biopsia fijo en parafina (Giuliano, 2006). Así mismo se ha propuesto el análisis de metilación de la región promotora de ER α como una alternativa para predecir la respuesta a la terapia endocrina (Widschwendter *et al.*, 2004).

Más recientemente, Iorns y colaboradores identificaron que la represión de la expresión de *CDK10* conllevaba a resistencia a tamoxifeno (Iorns *et al.*, 2008) y que dicha represión podía ser detectada analizando la metilación de la región promotora del gen. En su estudio muestran que pacientes con tumores positivos para ER α que a su vez expresan bajos niveles de CDK10 recaen pronto bajo el tratamiento con tamoxifeno (Iorns *et al.*, 2008).

En conclusión, las pacientes cuyos tumores primarios son receptores hormonales positivos tienen un curso más favorable (Ramírez-Ugalde *et al.*, 2003) y presentan una ventaja importante para los cánceres de mama metastásicos, de modo que hasta el 60% de las pacientes con cáncer mamario metastásico responderán a la manipulación hormonal (Giuliano, 2006).

Otro marcador importante es el receptor HER2 (también conocido como erbB2 o neu), un miembro del subgrupo de los receptores de membrana del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Grow Factor Receptor* [EGFR]) (Natali *et al.*, 1990; Tovey *et al.*, 2009; Wulfing *et al.*, 2006). Mientras que dicho receptor se encuentra en concentraciones bajas en células normales y tumores benignos, en una porción de pacientes con cáncer de mama se encuentran hasta 100 veces más receptores HER2/neu. Esto sugiere que el gen HER2 está involucrado en el proceso maligno de transformación y de progresión del tumor.

Si bien el receptor HER2 puede estar sobreactivado como consecuencia de una mutación que acarree un receptor que no necesita ser fosforilado (independiente de herregulinas y el factor de activación neu) (Press *et al.*, 1990; Lonardo *et al.*, 1990) o una

mutación en una leucina del dominio transmembranal de activación del receptor (lo que ocasiona la independencia de EGF) (Olayioye *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006), la sobreexpresión del receptor HER2 puede determinarse sobre tejido de biopsia fijo en parafina mediante técnicas de inmunohistoquímica o hibridación *in situ* fluorescente (Giuliano, 2006; Kakar *et al.*, 2000).

Varios estudios han demostrado que el gen HER2 está sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama (Press *et al.*, 1993). Así mismo se ha demostrado que el estatus de HER2 puede ser un marcador muy útil para la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia (Press *et al.*, 2002; Romond *et al.*, 2005) y se ha visto que la sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de las células de cáncer de mama puede ser usada como diana para el anticuerpo terapéutico trastuzumab (véase apartado tratamiento biológico) (Carter *et al.*, 1992), mismo que se une con alta afinidad a la proteína HER2 inhibiendo la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* (Hudziak *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1993; Baselga *et al.*, 1998).

Los marcadores: ER, PR y HER2 conforman el fenotipo triple negativo del que se habla en el apartado Heterogeneidad del cáncer de mama y han sido utilizados como panel con el fin de pronosticar la supervivencia de pacientes con cáncer de mama (Cheang *et al.*, 2008; Haffty *et al.*, 2006). Sin embargo la adición de nuevos marcadores al panel permitirá una clasificación más fina evitando la quimioterapia insuficiente o excesiva que reciben algunas pacientes como consecuencia de una mala clasificación (Mirza *et al.*, 2002; Esteva y Hortobagyi, 2004).

La creciente aceptación de que la hipermetilación del DNA es un evento temprano y común en la carcinogénesis (Esteller, 2007; Lo y Sukumar, 2008; Agrawal *et al.*, 2007; Egger *et al.*, 2004; Jones y Baylin, 2002), ha llevado a la búsqueda de marcadores como *PITX3* y *AQP3* (que al ser analizados por microarreglos mostraron estar hipermetilados en muestras de carcinomas invasivos y no-metilados en muestras de reducciones mamarias de pacientes aparentemente sanas).

PITX3 es un factor de transcripción *homeobox* mayormente estudiado en el cristalino del ojo, donde se ha encontrado que regula la diferenciación y expresión de genes *crystallin* durante la formación del cristalino (Ho *et al.*, 2009). Así mismo se ha encontrado que el gen α B-crystallin es comúnmente expresado en tumores basales (Moyano *et al.*, 2006), aumentando el interés en el gen *PITX3*, pues éste podría ser usado para predecir una supervivencia pobre (peor pronóstico) en pacientes con cáncer de mama. Si bien, Dietrich y colaboradores (2009) reportaron la metilación en el gen *PITX3* en células microdisectadas de cáncer de mama, no presentaron evidencia suficiente para proponerlo como marcador del cáncer mamario.

AQP3 pertenece a la familia de proteínas llamadas acuaporinas las cuales resultan ser canales de agua expresados ampliamente en endotelio vascular, donde juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del agua (Verkman, 2005). Recientemente se encontró que AQP3 facilita la migración celular, como se ha visto en la angiogénesis tumoral dependiente de acuaporina y metástasis tumoral (Verkman, 2008; Verkman, 2009; Wang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, no existen reportes de la expresión de *AQP3* en tejido o líneas celulares de cáncer de mama.

Estos marcadores, así como posiblemente otros futuros podrían permitir no sólo un diagnóstico temprano sino también optimizar la respuesta al tratamiento y seguimiento de las pacientes (Figura 13). Mediante técnicas de análisis de metilación de DNA que permiten la detección cuantitativa y específica de genes supresores tumorales hipermetilados en todo tipo de fluidos biológicos y especímenes de biopsia (Esteller, 2008).

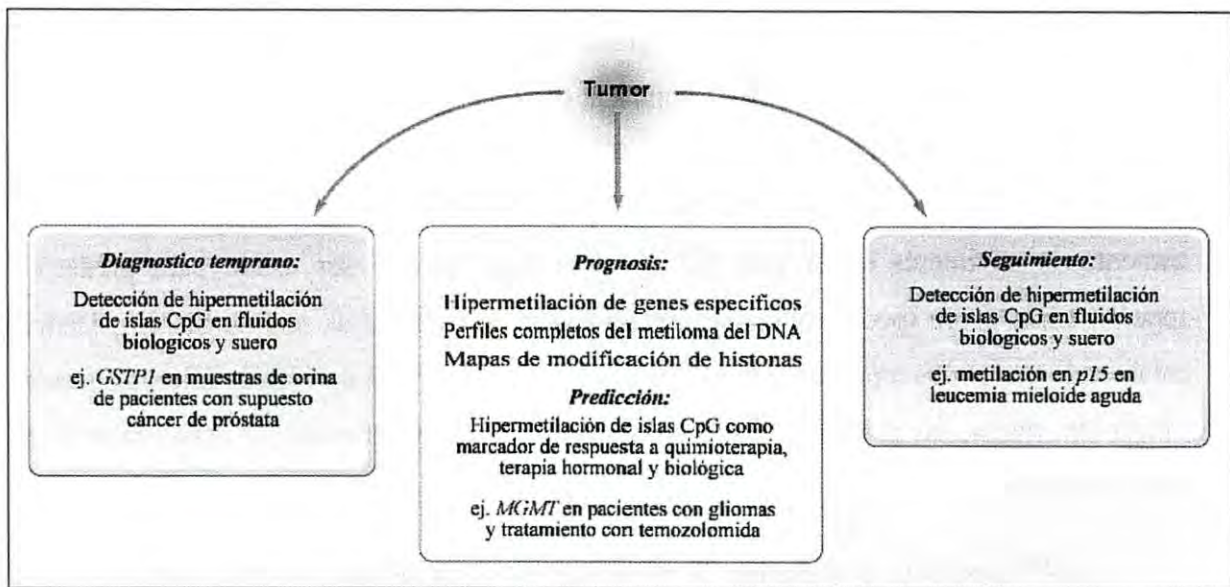


Figura 13. Gestión epigenética del cáncer.
Fuente: Esteller, 2008

2.13 Tratamiento del Cáncer de Mama

El tratamiento contra el cáncer de mama busca la eliminación de cada una de las células que lo componen, con el fin de prevenir la invasión de tejido adyacente y/o distante. Si bien las células normales están sujetas a varios procesos que regulan su correcto funcionamiento y degradación, las células cancerosas escapan a dichas regulaciones al grado de representar un problema de salud para el hospedero. De hecho a mediados de los 80s, el cáncer de mama era considerado una herida que no había sido sanada, debido a la característica de regenerar el tejido epitelial, como en el proceso curativo de heridas (Dvorak, 1986). Siendo entonces el tratamiento principal la remoción quirúrgica del cáncer por mastectomía radical modificada (mastectomía total más disección de los ganglios linfáticos axilares) (Fisher *et al.*, 1985).

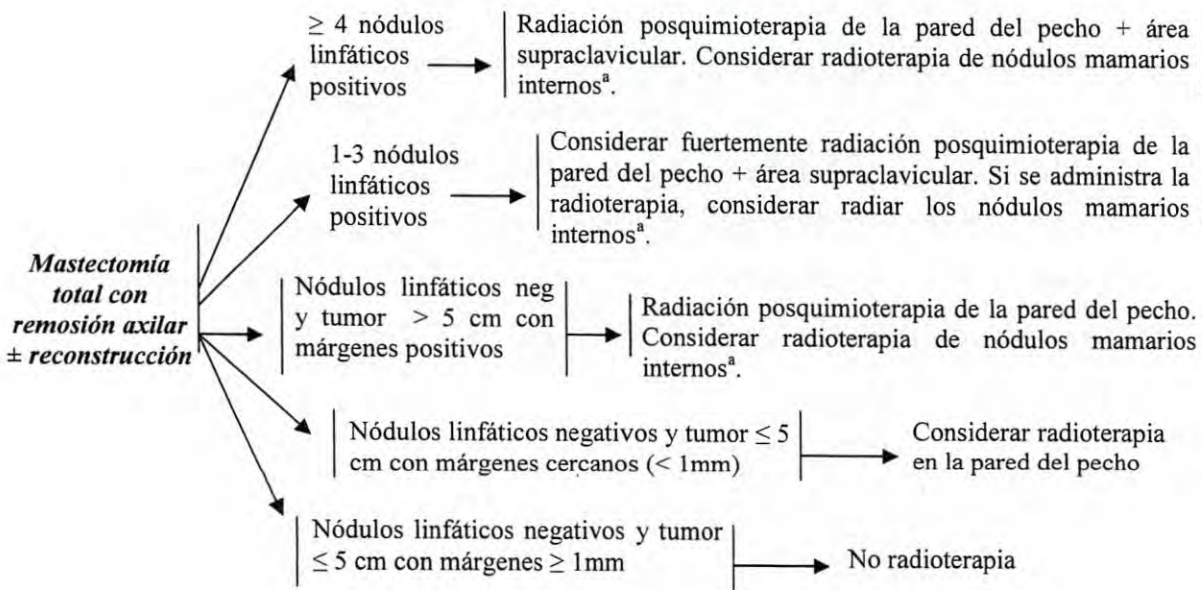
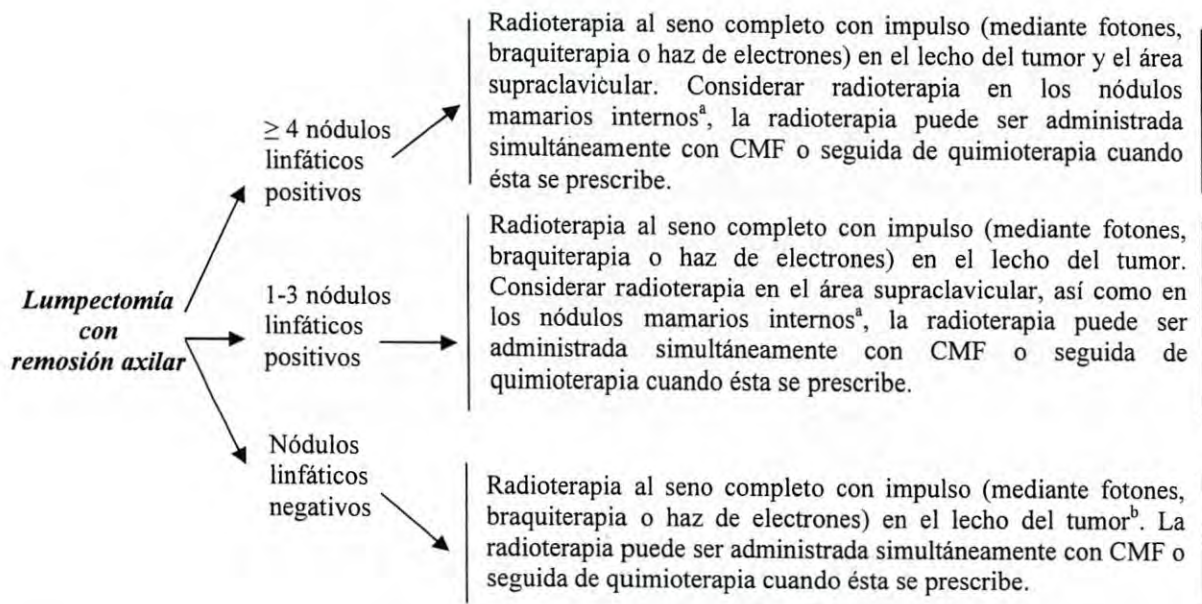
En la actualidad la cirugía se ha vuelto más conservadora, siendo posible la realización de lumpectomías (resección del tumor con márgenes libres de tumor confirmados) debido a que cuenta con tratamientos complementarios que hacen de la terapia un campo multidisciplinario (Fisher *et al.*, 2002). Así se requiere del análisis de factores pronóstico y

predictivos (revisados con anterioridad), así como del estado general de la paciente, sus enfermedades anteriores y sus condicionamientos psicológicos (Harris *et al.*, 2008; Imaginis, 2009; Rodríguez *et al.*, 2000).

Tanto en los estadios tempranos (I y II) como en el estadio III es muy posible curar el cáncer de mama; la realización de una lumpectomía o mastectomía radical modificada dependerá del estadio del tumor (Benhaim *et al.*, 2000; Harris y Solin, 2000) (Figura 14). El tratamiento adyuvante subsecuente más común es la quimioterapia, la cual consiste en la administración de fármacos que tienen por objeto impedir la reproducción de las células cancerosas y eliminar las metástasis ocultas causantes de recurrencias tardías mientras son microscópicas y más vulnerables a los agentes anticancerosos. El criterio de si se administra o no esta terapia depende una vez más de factores pronóstico, como es el estadio del tumor, y factores predictivos, como los marcadores tumorales (Chu y DeVita, 2002). En los casos en los que la quimioterapia es administrada de manera previa a la cirugía, con el fin de reducir el tamaño del tumor, ésta se conoce como quimioterapia neoadyuvante (Giuliano, 2006; Chu y DeVita, 2002).

Actualmente se cuenta con una amplia gama de quimioterapéuticos, y éstos son administrados dependiendo de las características de cada paciente como son los problemas colaterales del cáncer de mama teniendo en cuenta que no se trata una enfermedad aislada (como son nefropatías, cardiopatías, otros cáncers, etc.). Procurando utilizar fármacos que ataquen dianas específicas en diferentes etapas del ciclo celular, con el menor índice de toxicidad posible y económicamente accesibles. Entre los varios esquemas de tratamiento usados por los oncólogos clínicos podemos destacar el esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) el cual involucra agentes alquilantes, que interfieren en la división celular al inhibir la replicación del DNA estableciendo sólidos puentes de unión entre ambas hebras del DNA, y antimetabolitos celulares, en los que se han introducido uno o dos cambios en su estructura química, usados indiscriminadamente por la célula (Bellon *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2000).

Cualquiera que sea el esquema utilizado, el objetivo es combinar varios fármacos para así proveer al paciente de la máxima muerte de células tumorales bajo un rango de toxicidad tolerable por el hospedador, además de permitir un mayor rango de interacción con la población heterogénea del tumor (Chu y DeVita, 2002). Es importante, además, realizar análisis clínicos de sangre entre un ciclo de quimioterapia y el siguiente (14-21 días), con fin de aplicar la dosis adecuada tratando de afectar lo menos posible al sistema inmune (Rodríguez *et al.*, 2000).



Si T2 o T3 y cumple los criterios de la cirugía conservadora (excepto por el tamaño) → Considerar quimioterapia neoadyuvante (previa a cirugía)

Figura 14. Diagrama de tratamiento locorregional del estadio clínico I, IIA o IIB (T3, N1, M0).

^a La radioterapia deberá ser administrada a los nódulos linfáticos del interior de la mama si son patológicamente positivos, de otra manera el tratamiento a los nódulos mamaríos internos es a consideración del radiólogo oncólogo tratante.

^b La irradiación del seno puede omitirse en mujeres de 70 años o más con receptores a estrógenos positivos, nódulos clínicamente negativos y tumores T1 que recibieron terapia hormonal.

*CMF: ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo.

Fuente: NCCN, 2008.

En algunos casos de estadios avanzados (III y IV) es posible que sea necesario administrar radioterapia cuando existe metástasis o el riesgo es alto, por tanto su administración depende directamente del número de nódulos linfáticos afectados (independientemente del tratamiento quimioterapéutico recibido). Este tratamiento con radiación ionizante basa su acción biológica en su capacidad de producir radicales libres al interactuar con la materia y ceder la energía que transportan. Los radicales libres actúan produciendo roturas en enlaces en moléculas biológicas, siendo la más sensible el DNA. Todo ello redundaría en la inactivación celular (daño letal) o en lesiones más o menos reparables (daño subletal) (Rodríguez *et al.*, 2000).

Tanto la quimioterapia como la radioterapia producen toxicidad que algunas veces puede resultar en daños colaterales a largo plazo que a su vez pueden reducir el tiempo de supervivencia de las pacientes (Esteve y Hortobagyi, 2004; Lemieux *et al.*, 2008). Por ello es importante identificar estrategias novedosas que ataquen selectivamente a las células malignas y preserven el tejido sano de las pacientes (Chu y DeVita, 2002). De hecho en los cánceres metastáticos (etapa IV), donde el tratamiento generalmente se enfoca al alivio de los síntomas y extender el tiempo de vida de la paciente (paliación), el procedimiento subsecuente a la mastectomía radical modificada es un tratamiento dirigido basado en el estado de los marcadores hormonales y HER2 (Rodríguez *et al.*, 2000) (Figura 15).

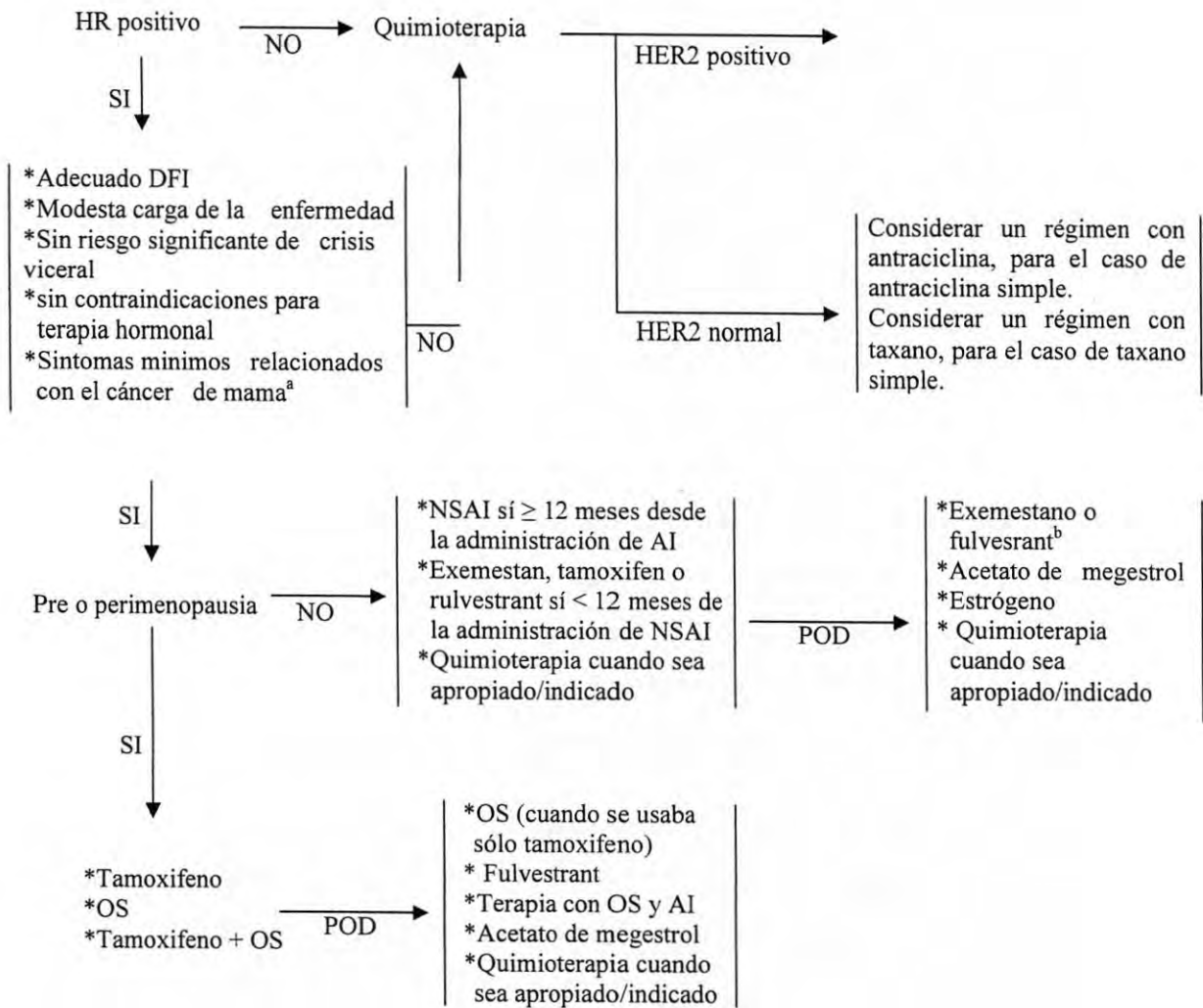


Figura 15. Diagrama de estrategias de tratamiento para cáncer de mama metastásico, considerando algunas características del tumor.

^a Se deberá considerar además a priori la terapia hormonal, edad, enfermedades coomorbidas, así como las preferencias del paciente.

^b Cuando se usaba sólo NSAI previamente.

AI, Inhibidor de aromatasa; DFI, Intervalo libre de enfermedad; HER2, human epide hormonal; MBC, cáncer de mama metastásico; NSAI, inhibidor nosteroidal de arom

Fuente: McArthur y Hudis, 2007.

Considerar un régimen con trastuzumab.
Considerar uso de capecitabina y lapatinib tras progresión con antraciclina, taxanos y trastuzumab.

2.14 Tratamiento Hormonal

En los cánceres mamarios en los que el crecimiento celular está influenciado por hormonas es posible administrar un tratamiento hormonal. Este tratamiento puede ser la remoción quirúrgica de ambos ovarios (ooforectomía), también conocida como terapia ablativa, o administración de sustancias exógenas para que produzcan una modificación del ambiente tumoral, llamada también terapia aditiva o competitiva (Rodríguez *et al.*, 2000).

El tamoxifeno es el anti-estrógeno más usado en el tratamiento estándar actual y ejerce su acción durante la fase lútea del ciclo menstrual (Uehara *et al.*, 1998) mediante un mecanismo de acción diverso: a) se unen a los receptores estrogénicos, lo que impide la acción de los estrógenos en la célula diana e interfiere el crecimiento tumoral; b) bloquean las células en la fase G₁; c) aumentan el número de receptores de progesterona, y d) impiden la separación de los estrógenos circulantes de las proteínas transportadoras. El uso de tamoxifeno debe ser independientemente de la edad de la paciente o su estado menopáusico, pero dependiente del estadio del tumor (Rodríguez *et al.*, 2000) (Figura 16).

Aunque los inhibidores de la enzima aromatasa han ganado fuerza en el tratamiento de pacientes posmenopáusicas, ya que ésta enzima actúa sobre los andrógenos suprarrenales convirtiéndolos en estrógenos aún en ausencia de los ovarios (Baum, 2002; Winer *et al.*, 2002), la Sociedad Americana de Oncología Clínica recomienda el empleo de tamoxifeno como tratamiento hormonal adyuvante en caso de que no haya contraindicaciones significativas, probablemente por ser de precio más accesible (Rodríguez *et al.*, 2000).

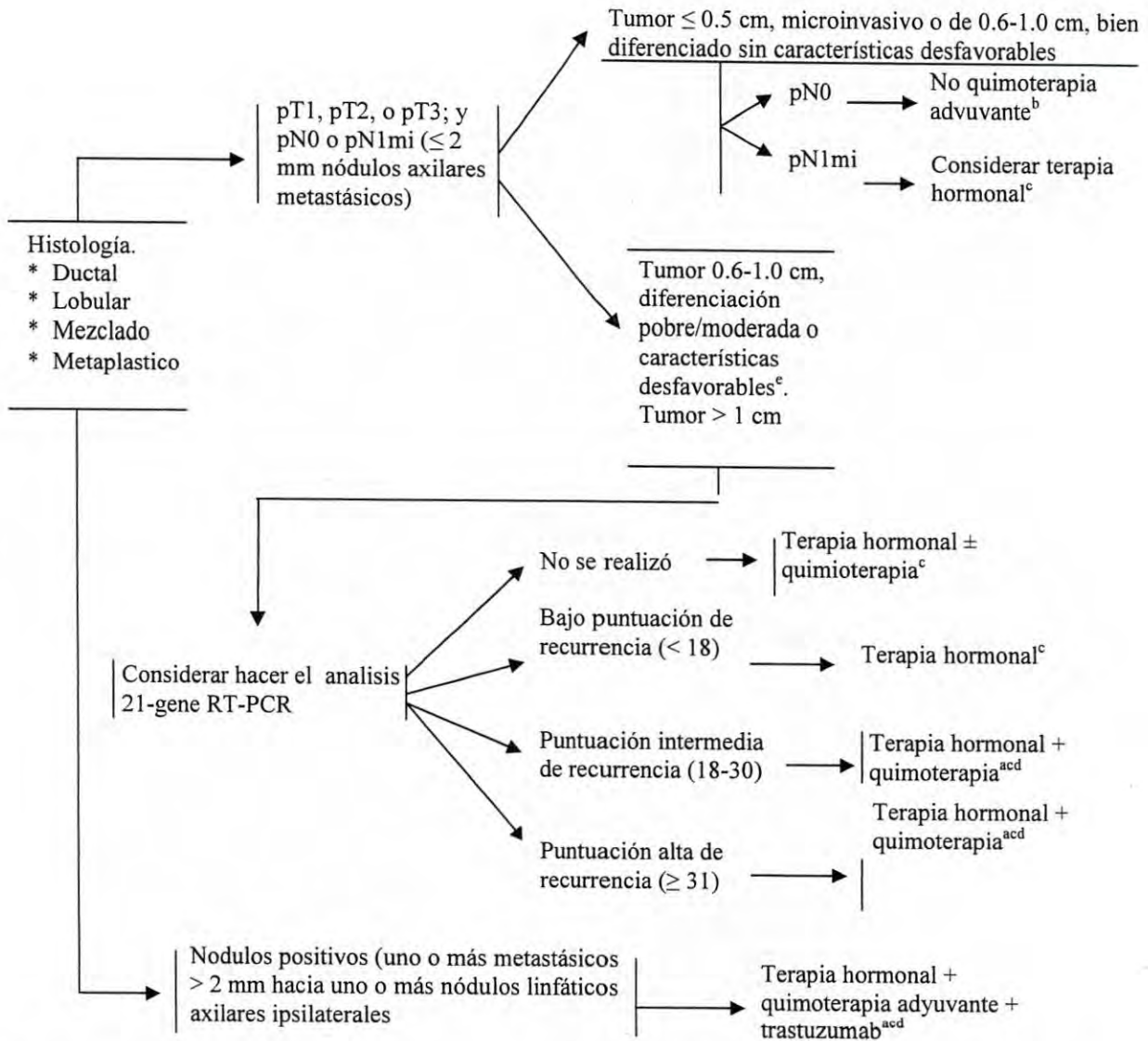


Figura 16. Diagrama de terapia sistémica adyuvante en mujeres con enfermedad positiva a receptores hormonales y HER2 negativo.

^a El tratamiento deberá ser individualizado considerando otras condiciones.

^b Si ER es positivo considerar terapia hormonal para reducir el riesgo de recurrencia.

^c La evidencia respalda que la magnitud del beneficio de ooforectomía o eliminación de los ovarios por radiación en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama con receptores a hormonas positivo es similar al reportado para el esquema CMF sólo (ciclofosfamida-metotrexano-fluorouracilo). Evidencia reciente sugiere beneficios similares a partir de la supresión ovárica (ej. antagonistas hormonales) como de la ablación/supresión en mujeres premenopáusicas que no se sabe si recibirán quimioterapia adyuvante.

^d Tanto la hormono terapia como la quimioterapia usadas como terapia adyuvante deberá aplicarse en ésta secuencia (terapia hormonal seguida de quimioterapia). Los beneficios de la quimioterapia y la terapia hormonal se suman. Sin embargo, el beneficio absoluto de la quimioterapia puede ser pequeño. La decisión de añadir quimioterapia a la terapia hormonal debe individualizarse, especialmente en esos casos con pronóstico favorable y en mujeres de edad ≥ 60 años y donde los beneficios incrementados de la quimioterapia podrían ser más pequeños. Datos disponibles sugieren que es aceptable el uso de terapia hormonal secuencial o simultaneo a la radioterapia.

^e Características desfavorables: invasión angiolinfática, grado nuclear alto, o grado histológico alto.

Fuente: NCCN, 2008.

2.15 Terapia Biológica

La terapia biológica actúa de manera específica para un antígeno particular que se expresa de manera única o predominante en la célula tumoral; al basarse en el uso de anticuerpos monoclonales también es llamada terapia inmunológica.

En los cánceres mamarios que expresan valores altos de la proteína HER2 (receptor de factores de crecimiento codificado por el oncogén *HER2*) es posible administrar este tipo de terapias, usando anticuerpos, como trastuzumab, que se unan con gran afinidad al receptor HER2 e inhiban el crecimiento de tumores con valores altos de estos receptores (Rodríguez *et al.*, 2000). Aunque el trastuzumab puede ser eficaz como agente único, el mayor beneficio de esta terapia puede derivar del efecto sinérgico que ejerce con la quimioterapia adyuvante (García-Foncillas, 2003), usando como base el estadio del tumor (Figura 17), y en algunos casos, cuando los receptores hormonales son positivos, con la terapia hormonal (NCCN, 2008).

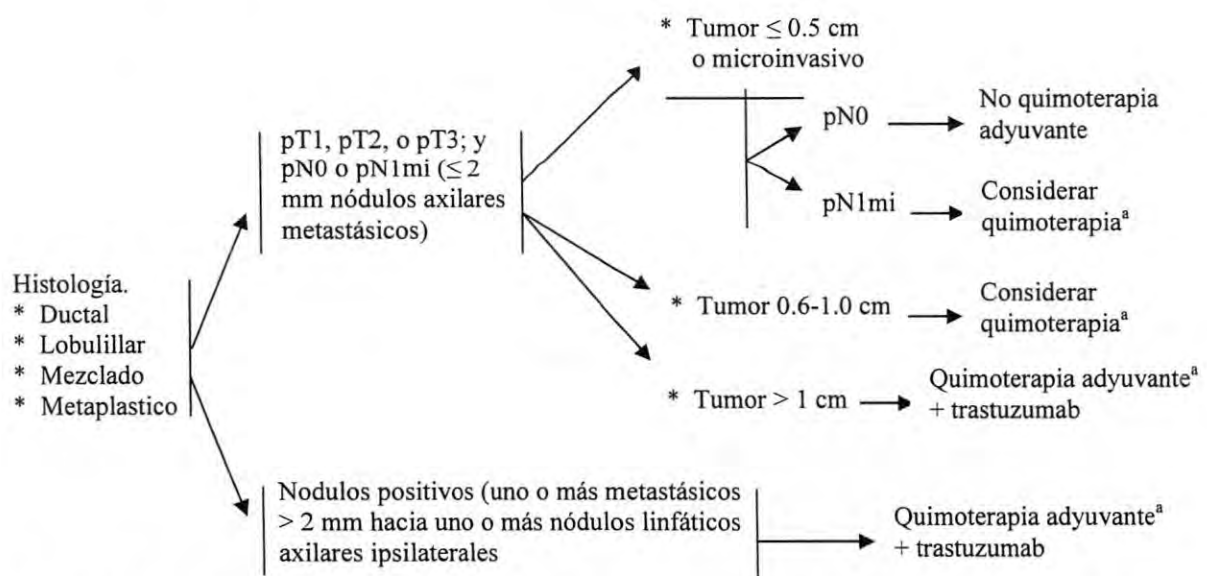


Figura 17. Diagrama de terapia sistémica adyuvante en mujeres con enfermedad negativa a receptores hormonales y HER2 positivo.

^a El tratamiento deberá ser individualizado considerando otras condiciones.

Fuente: NCCN, 2008.

2.16 Otras Terapias Novedosas.

Los retinoides (derivados de la vitamina A) han sido estudiados por afectar la expresión genética tanto de manera directa, activando y/o suprimiendo genes específicos, como indirecta, interfiriendo en las diferentes vías de traducción de señales. La fenretinida, un retinoide sintético, ha mostrado una tendencia favorable a la reducción de segundas malignidades mamarias en mujeres premenopáusicas (Zanardi *et al.*, 2006). Por otro lado, el ácido retinoico podría representar una nueva diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer de mama potenciando el efecto de los ya utilizados, como el tamoxifeno (Hua *et al.*, 2009). Estos nuevos fármacos podrían ser utilizados de manera coordinada con el método de administración intraductal desarrollado recientemente, que permite la administración local de agentes antineoplásicos a pacientes con cáncer de mama o en alto riesgo de padecerlo, evitando los efectos colaterales de la terapia sistémica (Murata *et al.*, 2006).

Actualmente varios grupos de investigación en todo el mundo trabajan en el desarrollo de nuevos tratamientos para prevenir o tratar el cáncer de mama. Algunos científicos han propuesto enfocarse al microambiente de las células cancerosas como estrategia terapéutica. En esta área se ha observado que la eliminación de macrófagos asociados a tumores, mediante el uso de vacunas, reduce el crecimiento del tumor y su progresión (Polyak, 2007). También se ha sugerido como estrategia, el desarrollar fármacos contra las moléculas que le permiten a la célula adaptarse a la hipoxia en su microambiente, como las moléculas HIF o HSP (Tsutsumi y Neckers, 2007), así como contra receptores de quemoquinas lo que frenaría la invasión metastásica del cáncer mamario (Taborga *et al.*, 2007).

Así mismo, debido a que las alteraciones epigénéticas en cáncer son necesarias para que una célula cancerosa se adapte a su microambiente y a que dichas alteraciones son potencialmente reversibles, la epigenética se ha presentando como la solución indemne de tratamiento. Se pudieran utilizar agentes inhibidores de DNMTs (Yoo y Jones, 2006) y desacetilación de histonas (Bolden *et al.*, 2006) para recuperar la expresión genética y la funcionalidad de las células dañadas (Esteller, 2007; Herman y Baylin, 2003). De momento son dos los inhibidores más estudiados, la 5-azacitidina (VidazaTM) y la 5-aza-2'-deoxicitidina

(Decitabine). La acción farmacológica de ambos compuestos es mediada por su incorporación dentro del DNA en el sitio de la base citosina durante la replicación del DNA, quedando covalentemente atrapados (Jones y Taylor, 1980), causando la pérdida de actividad de las enzimas DNMTs y del patrón de metilación.

El efecto inhibitor de 5-aza-2'-deoxicitidina es más fuerte que el de 5-azacitidina; ya que la primera se incorpora sólo dentro del DNA, mientras que la segunda lo hace también en el RNA (Hellebrekers *et al.*, 2007a). Ambos compuestos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de leucemias (Muller *et al.*, 2006; Oki *et al.*, 2007), pero aún continúa la búsqueda de compuestos inhibidores más estables con actividad clínica en tumores sólidos (Mack, 2006; Cheng *et al.*, 2004).

2.17 Resistencia al Tratamiento y Recurrencia

Es posible que tras la extirpación del tumor primario y el subsecuente tratamiento adyuvante la paciente sufra una recaída principalmente en las pacientes con ganglios linfáticos positivos. Las recurrencias locales y distantes se producen con mayor frecuencia durante los primeros dos años posteriores al tratamiento. Durante este periodo la paciente debe ser examinada cada seis meses y más adelante cada año.

En la tabla 4 se especifican algunos de los factores pronóstico que ayudan al oncólogo clínico a estimar la probabilidad de recurrencia en pacientes con ganglios negativos, ya en estos casos las metástasis son latentes durante periodos prolongados y pueden aparecer 10 o 15 años después de la extirpación del tumor primario (Giuliano, 2006; Edsander-Nord *et al.*, 2001; Herd-Smith *et al.*, 2001).

Tabla 4. Factores pronóstico en el cáncer mamario con ganglios negativos.

Factor pronóstico	Aumento de recurrencia	Disminución de recurrencia
Tamaño	T3, T2	T1, T0
Receptores de hormonas	Negativa	Positiva
Grado histológico	Alto	Bajo
Fracción de fase S	> 5%	< 5%
Invasión linfática o vascular	Presente	Ausente
Oncogén HER-2/neu	Alto	Bajo

Fuente: Giuliano, 2006.

Estas recurrencias normalmente son la consecuencia de un tratamiento insuficiente. En la búsqueda de una respuesta se han propuesto dos hipótesis. La primera maneja que entre la población tumoral se encuentran algunas células madre cancerosas que son extremadamente resistentes a las fluctuaciones en temperatura, pH y exposición a tóxicos (Miyagi *et al.*, 2001; Woodward *et al.*, 2005) y podría no ser necesariamente seleccionadas por las drogas que ataquen a la células madre normales (Cariati y Purushotham, 2008). Esta hipótesis fue reforzada por Fillmore y Kuperwasser (2008) al encontrar que las células madre cancerosas (CD44+/CD24-/ESA+) exhiben propiedades de auto-renovación *in vitro*, son escasas en tumores de mama, de división lenta y resistente a quimioterapia.

La segunda hipótesis se basa en el supuesto de que una de las vías de reparación del DNA es desactivada de forma temprana en la carcinogénesis, resultando en inestabilidad cromosómica y consecuentemente en mutaciones secundarias que le confieren una ventaja selectiva a las células dañadas, otras células cancerosas con diferentes alteraciones podrían conservar dicha vía. Como consecuencia, el tumor será inicialmente hipersensible al tratamiento que daña el DNA, sin embargo tras eliminar a la competencia y restaurar su DNA, con el tiempo el tumor maligno podría recurrir en su forma quimiorresistente (Figura 18).

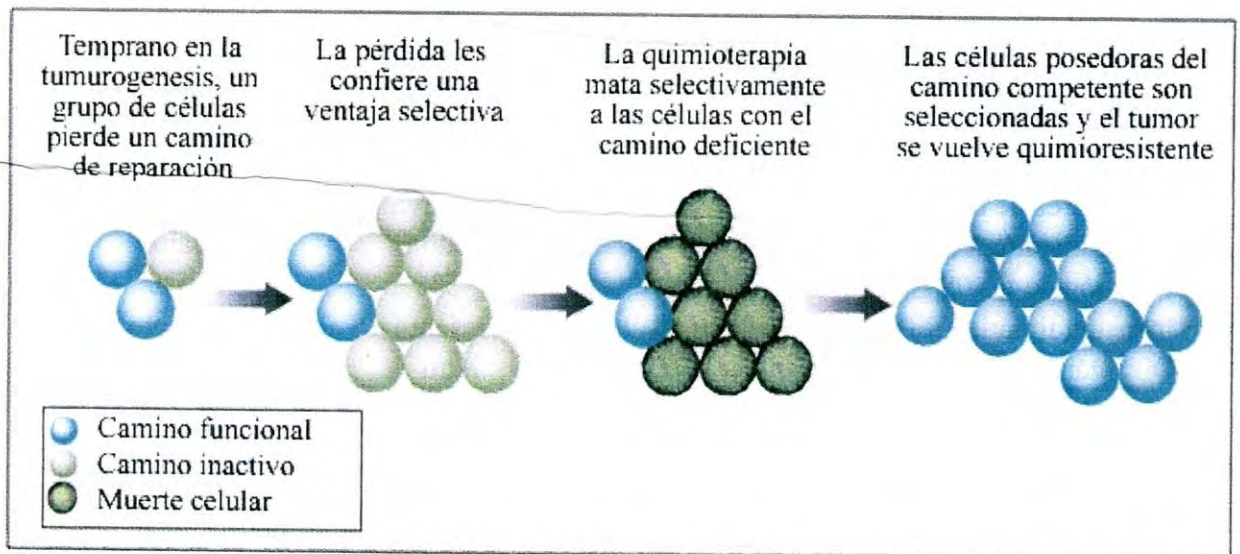


Figura 18. Inactivación y reactivación seriada de un camino de reparación del DNA en un tumor.

Fuente: Kennedy y D'Andrea, 2006.

III. HIPÓTESIS

La metilación en las islas CpG de la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* puede ser utilizada como biomarcador para incrementar la sensibilidad de clasificación del cáncer de mama y a su vez ser un indicador de la capacidad de un carcinoma *in situ* de progresar a carcinoma invasivo.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el índice de metilación acumulada de los genes *PITX3* y *AQP3* para ser utilizado como biomarcador de diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama en mujeres con estadios benignos de la enfermedad.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la eficiencia del método de análisis de metilación específica y cuantitativa de múltiples genes por PCR en tiempo real (QM-MSP) en el análisis de metilación.
- Relacionar el índice de metilación acumulada de *PITX3* y *AQP3* con los subtipos celulares en líneas celulares.
- Aplicar el QM-MSP para el análisis de metilación de la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* en organoides, tejido adyacente normal, DCIS e IDC.
- Comparar el índice de metilación acumulada de *PITX3* y *AQP3* entre tejido adyacente normal, organoides, DCIS, IDC y leucocitos.
- Analizar la correlación entre la metilación del gen *AQP3* y su expresión en una línea celular.
- Relacionar el estado de metilación de la región promotora del gen *AQP3* con su estado de expresión.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras Utilizadas en el Estudio

a) Líneas Celulares

Un total de 46 líneas celulares de cáncer de mama fueron adquiridas de la casa comercial ATCC. Estas fueron clasificadas de acuerdo al subtipo celular al que pertenecen (luminal o basal), así como por su capacidad de desarrollar un tumor al ser inyectadas en modelos xenogénicos de ratón.

b) Muestras Clínicas

Un total de 63 muestras de tumores mamarios humanos fueron obtenidos de los departamentos de patología quirúrgica del Hospital *Johns Hopkins* (Baltimore, MD; $n = 54$) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (Hermosillo, México; $n = 9$). Todas las muestras fueron recabadas de acuerdo a los lineamientos institucionales de protección a sujetos humanos y bajo el amparo del consentimiento informado de las pacientes, tras su evaluación patológica y confirmación de al menos 70% de células tumorales. Trece muestras fueron colectadas a partir de autopsias, seis de reducciones mamarias, once de tejido congelado tras la cirugía y treinta y tres de tejido embebido en parafina. Todos los casos fueron identificados por el reporte final de patología (sin datos personales) y reclutados por el personal de atención a la salud. Así mismo, cinco muestras de sangre de pacientes sanas y cuatro muestras de organoides (porción de conducto mamario con todos sus subtipos celulares) aisladas de reducciones mamarias fueron facilitadas por el laboratorio de la Dra. Sukumar (Universidad Johns Hopkins; Baltimore, MD). No se consideraron la etnia o edad de las pacientes para este trabajo.

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) fue definido como células epiteliales mamarias malignas contenidas entre los ductos (o estructuras tipo ductos), mientras que el carcinoma ductal invasivo (IDC) se definió como células epiteliales mamarias malignas invadiendo el estroma. Las muestras que contenían DCIS bien diferenciado, con diferenciación moderada o pobre diferenciación, fueron examinadas íntegramente; mientras que las muestras con IDC

acompañando DCIS fueron microdisectadas y etiquetadas como DCIS e IDC progresivo, respectivamente. Por otra parte, las muestras de tejido normal proveniente de reducciones mamarias (con diagnóstico de macromastia) no presentaban cambios patológicos o éstos eran mínimos (fibrosis y fibroadenomas).

La metodología seguida se resume a continuación en la figura 19, sin embargo cada tratamiento se explica a detalle en los apartados siguientes.

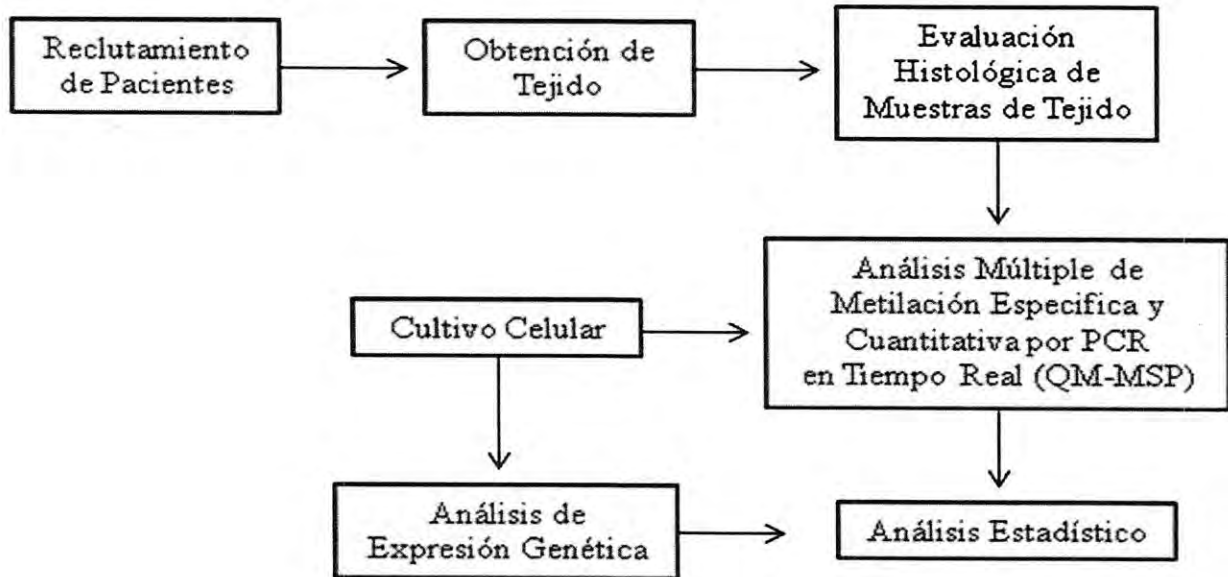


Figura 19. Diagrama metodológico.
PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

5.2 Evaluación Histológica de Muestras de Tejido

a) Tinción Hematoxilina/Eosina

Todos los casos fueron analizados en cortes de 4 μm de tejido embebido en parafina por la tinción universal de hematoxilina/eosina y preparados para su posterior observación y diagnóstico definitivo por parte de un médico patólogo. En algunos casos en los que no fue posible conseguir una de estas laminillas o que se trabajaba con tejido fresco fue necesario repetir la tinción en el laboratorio (Ahlgren, 2008).

b) Análisis de Marcadores

Tras el diagnóstico definitivo de cáncer mamario se realizó una evaluación histológica, así como un análisis semicuantitativo de las proteínas ER, PR, HER2 y Ki67 en el tejido tumoral, mediante una tinción inmunohistoquímica con kits comerciales de marca Dako y siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se utilizó una laminilla por marcador, misma que fue desparafinada y rehidratada bañando por duplicado en xileno por 5 min, seguido de dos baños en etanol absoluto por 3 min, dos baños en etanol al 95 % por 3 min y un baño en agua destilada por 30 seg. A continuación se colocó cada laminilla desparafinada en una solución epitope de recuperación precalentada en baño de vapor a 95 °C y se incubó manteniendo dicha temperatura durante 40 min. Se dejaron enfriar las laminillas a temperatura ambiente por 20 min. Se decantó la solución epitope de recuperación y se lavó cada laminilla con agua destilada. Finalmente se procedió a la unión de cada anticuerpo utilizando una plantilla de 10 pocillos y un soporte de laminillas, mismas que tras dos lavados con los búferes correspondientes fueron montadas con medio de montaje permanente (no acuoso).

5.3 Análisis Múltiple de Metilación Específica y Cuantitativa por PCR en Tiempo Real (QM-MSP)

En general el método de análisis se divide en dos pasos, el primero consiste en una PCR multiplex que amplifica las regiones de interés y el segundo en una PCR en tiempo real que detectara de manera selectiva DNA metilado o no-metilado (Figura 19).

a) Aislamiento de DNA, Tratamiento y Purificación

i) Extracción de DNA a partir de líneas celulares

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de cultivo utilizando 15 ml del medio correspondiente (tabla 5). Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia, éstos fueron lavados por duplicado con buffer de fosfatos y posteriormente se añadieron directamente a la placa 4 ml de buffer TNES para lisar la membrana celular de las células [1 ml de Tris 1 M (pH 8), 3.0 ml de NaCl 5M, 0.4 ml de EDTA 500 mM, 5 ml de SDS al 10% (todos de Sigma-Aldrich), diluido hasta 100 ml con ddH₂O], y tras transvasar los cultivos a un tubo eppendorf con tapa de 500 µl se añadió 1 mg de proteinasa K (EC

3.4.21.64; Invitrogen Life Technologies, Inc.) y las muestras fueron incubadas toda la noche a 37 °C, seguido de la extracción de DNA la cual se realiza añadiendo 4 ml de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) y lavando la capa superior primeramente con etanol absoluto y por segunda ocasión con etanol al 70 % (tras la correspondiente centrifugación a 2000 rpm por 10 min en cada caso), posteriormente se evaporó el etanol, se resuspendió el DNA en buffer TE y se determinó la ración de la absorbancia 260/280 de acuerdo al protocolo estándar (Sambrook y Russell, 2001). Bajo estas mismas condiciones se extrajo el control de DNA no-metilado (esperma humano; HSD) y el DNA de leucocitos (tras su separación por centrifugación sanguínea a 1000 rpm por 10 min).

Tabla 5. Características de las líneas celulares analizadas y condiciones de cultivo.

	<i>Línea celular</i>	<i>Subtipo</i>	<i>ER</i>	<i>PR</i>	<i>HER2</i>	<i>TP53</i>	<i>Edad</i>	<i>Tipo tumoral</i>	<i>Etnia</i>	<i>Medio de cultivo</i>
1	BT549	Ba B	-	[-]		++ ^M	72	IDC, pap	B	RPMI, 10% FBS
2	MCF7	Lu	+	+		+/- ^{WT}	69	PE	B	DMEM, 10% FBS
3	600MPE	Lu	+	[-]		-		IDC	-	DMEM, 10% FBS
4	BT20	Ba A	-	[-]		++ ^{WT}	74	IDC	B	DMEM, 10% FBS
5	HCC1500	Ba B	-	[-]		-	23/32	IDC	N	RPMI, 10% FBS
6	HCC3153	Ba	-	[-]		[-]			-	RPMI, 10% FBS
7	BT474	Lu	+	[+]	+	+	60	IDC	B	RPMI, 10% FBS
8	HCC1428	Lu	+	[+]	-	-	49	PE	B	RPMI, 10% FBS
9	CAMA1	Lu	+	[-]		+	51	PE	B	DMEM, 10% FBS
10	MDAMB134VI	Lu	+	[-]		+/- ^{WT}	47	IDC	B	DMEM, 10% FBS
11	HCC2185	Lu	-	[-]		[+]	49	MLCa	B	RPMI, 10% FBS
12	HBL100c	Ba B	-			++	27	N	B	DMEM, 10% FBS
13	HCC1395	CELL LINE	+	-	-	+	43	IDC	B	DMEM, 10%FBS
14	HCC202	Lu	-	-	+	-	82	IDC	B	RPMI, 10% FBS
15	HS578Tc	Ba B	-	[-]		++ ^M	74	AC	B	DMEM, 10% FBS
16	AU565 ^a	Lu			+	+	43	PE	B	RPMI, 10% FBS
17	HCC38	Ba B	-	-	-	+	50	IDC	B	RPMI, 10% FBS
18	UACC893	-	-	-			57	IDC	B	L-15, 10% FBS
19	HCC1143	Ba A	-	-	-	+	52	IDC	B	RPMI, 10% FBS
20	LY2	Lu	+	[-]		+/-	69	IDC	B	DMEM, 10% FBS
21	HCC1599	-	-	-	-	-	44	IDC	B	ACL4, 5% FBS
22	DU4475	-					70	IDC	B	RPMI, 10%FBS
23	HCC1187	Ba A	-	-	-	+	41	IDC	B	RPMI, 10% FBS
24	HCC1937	Ba A	-	-	-	-	23/24	IDC	B	RPMI, 10% FBS
25	MDAMB453 ^e	Lu	-	[-]		- ^{WT}	48	IDC	B	DMEM, 10% FBS
26	HCC70	Ba A	-	[-]	-	+	49	IDC	N	RPMI, 10% FBS
27	HCC1954	Ba A	-	-	+	[+/-]	61	IDC	IE	RPMI, 10% FBS
28	HCC1806	-					60	IDC	N	RPMI, 10% FBS
29	MDAMB415	Lu	-	-	-	-	38	AC	AM	DMEM, 10%FBS
30	T47D	Lu	+	[+]		++ ^M	54	PE	-	RPMI, 10% FBS
31	MDAMB231	Ba B	-	-	+	+	51	PE	B	DMEM, 10% FBS
32	MCF12A ^{bc}	Ba B	-	[-]		+	60	N	B	DMEM/F12 [*]
33	HCC2218	-	-	+	+	+	38	IDC	B	RPMI, 10% FBS
34	ZR75-30	Lu	+	[-]	+	- ^{WT}	47	AF	N	RPMI, 10%FBS
35	SKBR3 ^a	Lu	-	-	+	+	43	PE	B	McCoy's 5A, 10% FBS
36	MDAMB175VII	Lu	+	[-]		+/- ^{WT}	56	IDC	N	DMEM, 10% FBS
37	ZR75-1	Lu	+	[-]		-	73/63	AF	B	RPMI, 10% FBS

38	HCC1419	-			+	-	42	IDC	H	RPMI, 10% FBS
39	UACC812	Lu	-	-	+		43	IDC	-	DMEM, 10% FBS
40	MCF10A ^{bc}	Ba B	-	[-]		+/- ^{WT}	36	N	B	DMEM/F12*
41	MDAMB436 ^c	Ba B	[-]	[-]		[-]	43	IDC	B	L15, 10% FBS
42	HCC1569	Ba A	-	-	+		70	IDC	N	RPMI, 10% FBS
43	MDAMB468	Ba A	-	-	-/+	+	51	PE	N	L15, 10% FBS
44	MDAMB361	Lu	+	+	+	+	40	IDC	B	DMEM, 10% FBS
45	MDAMB157	Ba B	-	[-]		-	44	MC	N	DMEM, 10% FBS
46	ZR75-B	Lu	+	[-]		+/-			-	RPMI, 10% FBS

AC, adenocarcinoma; AF, fluido de ascitos; AnCa, carcinoma anaplastico; ASC, carcinoma escamoso acantolitico; BaA, Basal A; BaB, Basal B; Ca, carcinoma; CWN, nódulos de pared toracica; F, enfermedad fibroquistica; IDC, carcinoma ductal invasivo; ILc, carcinoma lobular invasivo; Inf, inflamatorio; LN, nódulos linfáticos; Lu, luminal; MC, carcinoma metaplastico; MLCa, carcinoma lobular metastásico; N, normal; Pap, papiloma; ND, No determinado; P.Br, tumor mamario primario; PE, efusión pleural; B, Blanca; N, Negra; H, Hispanica; EI, India del Este; MA, Ancestría mezclada.

Se indica el estado ER/PR/HER2/TP53: ER/PR positivo, HER2 sobreexpresión, y niveles de la proteína TP53 y estado de mutaciones (obtenidas del sitio web de Sanger; M, proteína mutante; WT, proteína tipo salvaje). Los datos de expresión se derivan del mRNA y los niveles de proteína presentados en este artículo (Tabla S2 y Figura S4).

Los corchetes indican los niveles inferido por solo los niveles de mRNA cuando la información de proteínas no se encontraba disponible.

Condiciones del medio: FBS, suero fetal bovino; I, Insulina (0.01 mg/ml); H, hidrocortisona (500 ng/ml); E, EGF (20 ng/ml); DMEM, Medio Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO #11965-092; RPMI, medio 1640 RPMI, GIBCO #27016-021; Ham's F12, F-12 mezcla de nutrientes (Ham), GIBCO #11039-021; DMEM/F12, Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutritiva F-12 (D-MEM/F-12), GIBCO #11039-021; L15, medio L-15 de Leibovitz, GIBCO #11415-064. *Para MCF10A y MCF12A, se suplemento el medio DMEM/F12 con 5% de suero de caballo, 20 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxina colérica, 0.01 mg/ml de insulina y 500 ng/ml de hidrocortisona. **Para el medio libre de suero (SF), se suplemento el Ham F12 con 0.5 mg/ml de albumina sérica bovina, 5 mM de etanol amina, 10 mM de HEPES, 5 mg/ml de transferrina, 10 mM de T3, 50 mM de Se, 5 mg/ml de insulina, 1 mg/ml de hidrocortisona. ***Para el medio F12 que contiene suero, se suplemento con 5% de FBS, 5 mg/ml de insulina y 1 mg/ml de hidrocortisona o 10 ng/ml de EGF.

^aAU565 y SKBR3 fueron derivadas de la misma paciente.

^bDerivadas de reducciones mamarias.

^cLas líneas celulares HBL100, HS578T, MDAMB453, MDAMB415, MCF12A, MCF10A y MDAMB436 son tumorigenicas en ratón.

Datos de: (Neve et al., 2006, Berkeley-Lab, 2009, ATCC, 2009, CLS, 2009).

ii) Extracción de DNA a partir de tejido fresco y congelado

Tras la extracción del RNA con Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc.), se añadieron 500 µl de buffer de extracción reversa [Tiocianato de Guanidina 4 M, Citrato de Sodio 50 mM y Tris libre de base 1 M (pH 8)] a la fase orgánica y se siguieron las instrucciones del fabricante para la extracción de DNA a partir de Trizol. Para ello se partió de la fase orgánica remanente de la extracción de RNA libre de la fase acuosa (la fase acuosa residual fue removida), precipitando el DNA con 300 µl de etanol absoluto y mezclando por inversión. A continuación se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 min y se precipitó centrifugando a 2,000 rpm por 5 min (a 4 °C). El sobrenadante correspondiente a la capa de fenol-cloroformo fue removido y desechado, mientras que el pellet fue lavado doblemente con 1 ml de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10% (en cada lavado se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y se mezclo periódicamente) y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 min (a 4 °C). Posteriormente se resuspendió el pellet en 2 ml de etanol al 75% y se dejó reposar por 20

min a temperatura ambiente (mezclando periódicamente) para finalmente centrifugar a 2,000 rpm por 5 min (a 4 °C) y dejar secar por 15 min para resuspender el pellet con NaOH 8 mM (para obtener una concentración de 0.2-0.3 µg/µl).

iii) Extracción de DNA a partir de laminillas de tejido

Tras la desparafinación con xileno, se procedió a limar con ayuda de una navaja el tejido fijado sobre las laminillas y depositarlo dentro de un tubo eppendorf con tapa de 500 µl que contenía 30 µl de buffer lisador y 30 µg de proteinasa k (EC 3.4.21.64). Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 5 hrs a 52 °C, seguido de 10 min a 70 °C para la inactivación proteica.

iv) Hipermetilación del control CpG

El DNA extraído de la línea celular de cáncer de mama MDMB231 fue hipermetilado *in vitro* con SssI metiltransferasa (New England Biolabs Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se preparó una mezcla maestra con 5 µg de DNA, 5 µl de buffer de reacción (NEB2) 1X, 2 µl de S-adenosil L-metionina 32 mM (SAM; EC 3.1.4.-) y 16 unidades de SssI enzima (EC 2.1.1.37). A continuación, se diluyó la mezcla con ddH₂O a 50 µl y se incubó a 37 °C por 3 hrs; el volumen de reacción fue duplicado con la misma cantidad de mezcla maestra (sin DNA) y se prolongó la incubación por otras 4 hrs a 37 °C. Finalmente se realizó un último paso de inactivación por calor, a 60 °C durante 20 minutos. El DNA se precipitó añadiendo acetato de amonio y etanol al 100%, y el pellet lavado con etanol al 70%.

v) Conversión de citosinas no-metiladas

El DNA de la línea celular de cáncer de mama MDAMB231 y de esperma humano (HSD) fue convertido por bisulfito de sodio para ser usados como control en el análisis de metilación y no-metilación, respectivamente.

El tratamiento con bisulfito de sodio se desarrolló siguiendo el protocolo estándar para MSP de Herman y colaboradores (Herman *et al.*, 1996) usando 35 µl de cada muestra. Subsecuentemente, todas las muestras se purificaron usando las columnas de silica Zymo-Spin IC (Zymo Research) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se disolvieron en 15 µl de

ddH₂O precalentada. Tanto las muestras modificadas por bisulfito como los controles fueron alicuotados y guardados a -80 °C.

b) Diseño de Cebadores y Sondas

El siguiente paso fue diseñar sondas y cebadores para los genes *AQP3* y *PITX3* (Tabla 6) con el fin de analizar por QM-MSP (Swift-Scanlan et al., 2006) un panel de 46 líneas celulares (Tabla 5).

La secuencia de cada gen fue consultada en el banco de datos UCSC (UCSC, 2009) y utilizando el formato FASTA se marcó a los dinucleótidos CpG presentes en la región UTR y exón uno de cada gen, posteriormente, todas las citosinas restantes fueron intercambiadas por timinas (tomando en cuenta que todas las citocinas no metiladas presentes en el DNA será convertidas a timinas tras el tratamiento con bisulfito de sodio). Los cebadores deben seleccionarse lo más cerca posible al sitio de inicio de la transcripción (ATG). Los cebadores externos no deben contener dinucleótidos CpG, pero en caso de hacerlo como en el gen *AQP3* ejemplificado en la figura 20 es necesario especificarle a la casa comercial (en este caso Invitrogen) que los sintetice, que la citosina del dinucleótido CpG debe ser sustituida por una base que pueda unirse tanto a citosina como timina. Los cebadores internos deben estar comprendidos dentro de los externos y contener el mayor número de dinucleótidos CpG posibles (véase Tabla 6).

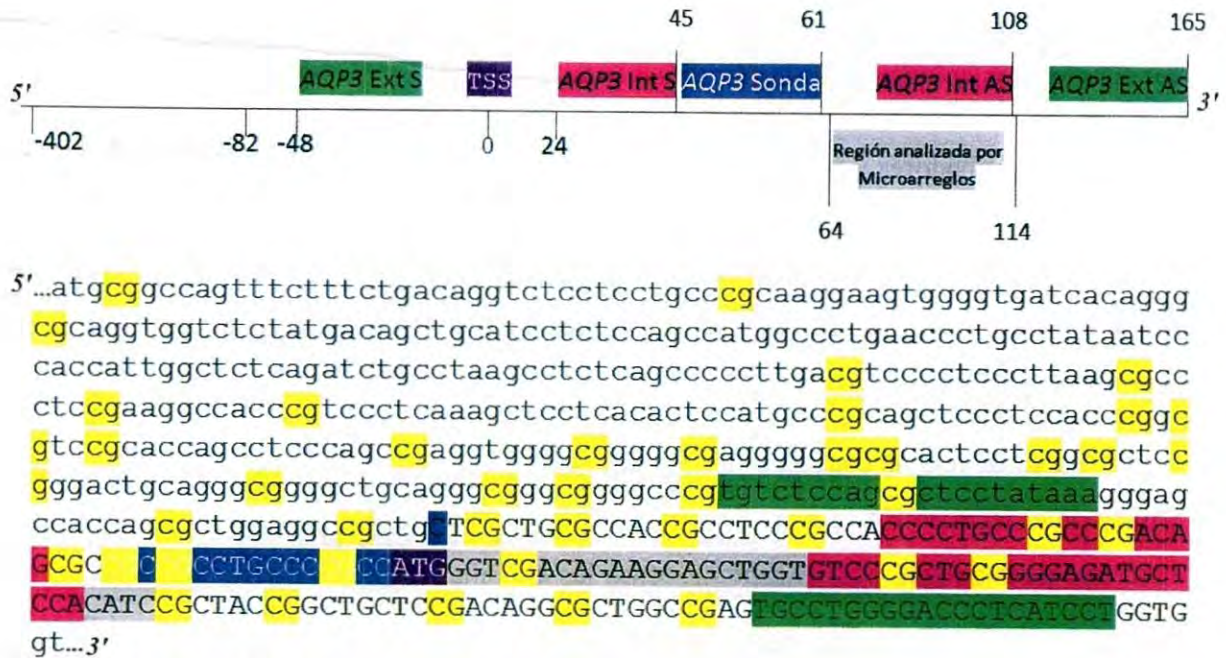


Figura 20. Región UTR y exón uno del gen *AQP3*.

Éste es un ejemplo de cómo se diseñaron los cebadores para el análisis de metilación. Donde TSS es el sitio de inicio de la transcripción y la región en mayúsculas representa al exón uno, mientras que Ext S e Int S son el cebador sentido externo e interno, respectivamente y Ext AS e Int AS son los cebadores antisentido externo e interno, respectivamente.

c) PCR Multiplex

Varias regiones genómicas de las muestras de DNA tratadas con bisulfito de sodio (DNA-NaBi) se amplificaron al mismo tiempo mediante PCR multiplex usando cebadores externos específicos que flanquean los sitios libres de islas CpG en la región promotora (Figura 21) para co-amplificar *PITX3* y *AQP3* (entre otros genes) usando hasta 1 µl de DNA-NaBi como templado en un volumen de reacción de PCR de 25 µl, bajo las condiciones especificadas en la tabla 6 (Fackler *et al.*, 2004).

d) PCR en Tiempo Real

La PCR multiplex se realizó en tubos para PCR de 500 µl con la siguiente composición: 0.2 µg de DNA-NaBi fue añadido a 23 µl de buffer de reacción [deoxinucleótidos trifosfatos 1.25 mM (Denville Scientific Inc.), (NH₄)₂SO₄ 16.6 mM, Tris 67 mM (pH 8.8) (ambos de Sigma-Aldrich), MgCl₂ 6.7 mM (USB Affymetrix, Inc.), β-mercaptoetanol 10 mM (Fluka Reagents), dimetil sulfóxido 0.1% (DMSO) (Sigma-Aldrich), y

2.5-5 unidades de Platinum Taq DNA polimerasa (Taq polimerasa; EC 2.7.7.7; Invitrogen Life Technologies, Inc.)] conteniendo 100 ng de cada uno de los cebadores sentido y contrasentido, bajo las condiciones especificadas en la tabla 6. Al concluir la reacción, los productos de PCR multiplex fueron diluidos 1:5 con ddH₂O y almacenados a -20 °C.

A continuación, se realizó una dilución adicional del DNA producto de PCR multiplex para la MSP cuantitativa en tiempo real (a una dilución final de 1:500). Para ello se utilizó 1 µl del DNA diluido, 2.5 µl de buffer de reacción 1X [(NH₄)₂SO₄ 16.6 mM, Tris 67.0 mM (pH 8.8), MgCl₂ 6.7 mM, β-mercaptoetanol 10.0 mM y dimetil sulfóxido 0.1% (DMSO)], 0.04 nano moles de desoxinucleotido trifosfato, 1.25 unidades de Ram Taq DNA polimerasa, 0.125 µl de tRNA como acarreador, y 0.3 µl de ROX 1X como colorante pasivo de referencia, 2.4 pico moles de cada uno de los cebadores, sentido y contrasentido, (todos de Invitrogen Life Technologies, Inc.) y 0.13 pico moles de cada sonda TAMRA etiquetada con FAM y VIC (Applied Biosystems Life Technologies, Inc.), para en DNA no-metilado y metilado respectivamente, en un volumen final de 25 µl.

La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en un equipo ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems Life Technologies, Inc.) combinando las dos sondas de tiempo real etiquetadas con los reportadores de color FAM y VIC en el mismo pocillo para cada gen, como en el protocolo (Fackler *et al.*, 2004) con los correspondientes ajustes para las sondas de acuerdo a Swift-Scanlan y colaboradores (2006). Así mismo, fueron incluidos controles blanco (sin DNA) con cada serie de reacciones de PCR en tiempo real.

La curva estándar, los controles y las muestras de DNA fueron preparados esencialmente como se describió por Fackler y colaboradores (2004) y el porcentaje de metilación de cada gen fue calculado como $[M / (no-M+M)] \times 100$ usando el método de cuantificación absoluta como se describió en dicho artículo.

Los cebadores para el DNA metilado y no-metilado presentan esencialmente la misma secuencia con excepción de las citosinas no metiladas que son remplazadas por timina durante la PCR (enlistados en la Tabla 6).

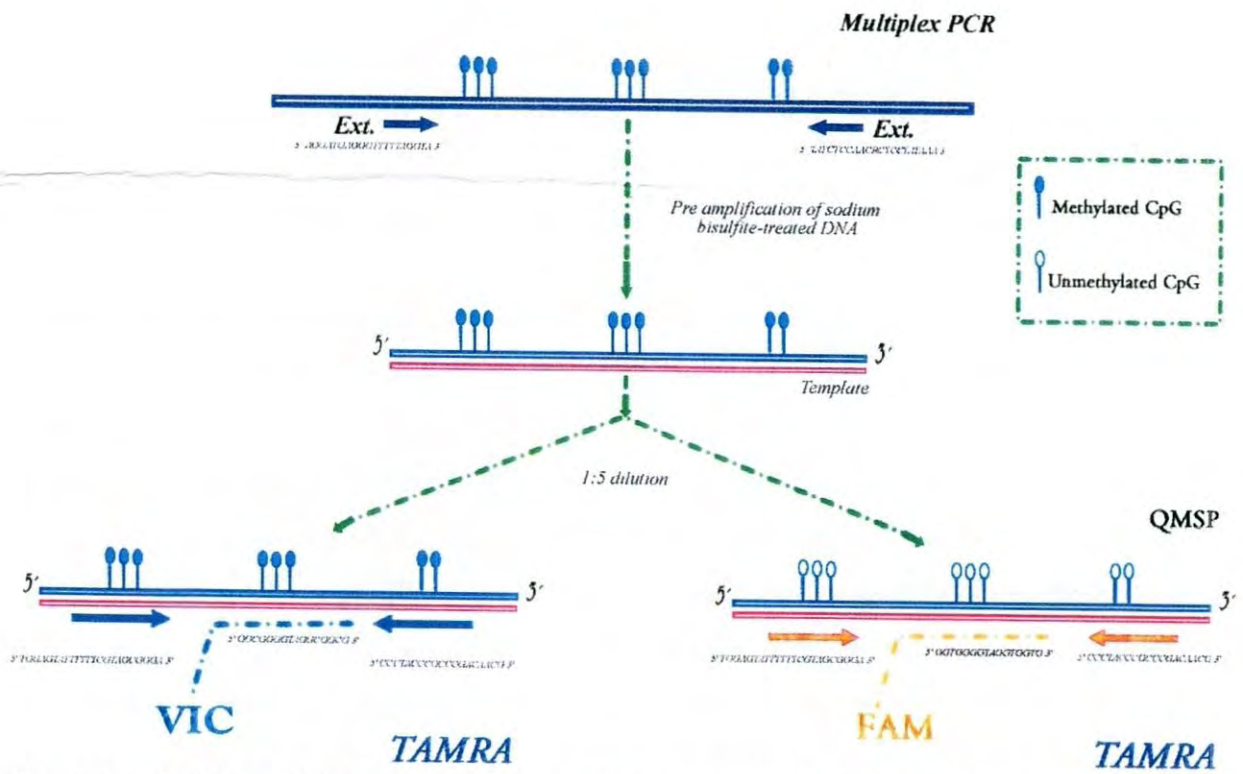


Figura 21. Análisis múltiple de metilación específica y cuantitativa por PCR en tiempo real (QM-MSP).

Tabla 6. Cebadores para el análisis de metilación.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR	Tiempo	Ciclos	Análisis	Tamaño (pb)
PITX3 Ext F	GTTTTGTAATAGGTAGATTTTITAG	95 °C	30 sec			
PITX3 Ext R	CTAATCTACCATAAAATAAATAAAC	56 °C	30 sec	36	Múltiple	213
		72 °C	45 sec			
PITX3 FM	TTTTAGTAGCGGCGGTTGCGG					
PITX3 RM	CCGAACGAAAAACGACCCGAA					
Sonda M	CCCACTCCGACCGAATACCCGAC	95 °C	15 sec	40	Tiempo	101
PITX3 FUM	TTAGTAGTGGTGGTTGTGGTGG	60 °C	1 min		Real	
PITX3 RUM	ACCCAAACAAAAAACAACCCAAAA					
Sonda UM	CCCACTCCAACCAATACCCAACC					
AQP3 Ext F	AGGATGAGGGTTTTTAGGTA	95 °C	30 sec			
AQP3 Ext R	TATCTCCAACRCTCCTATAAA	56 °C	30 sec	36	Múltiple	214
		72 °C	45 sec			
AQP3 FM	TGGAGTATTTTTTCGTAGCGGGA					
AQP3 RM	CCCTACCCGCCGACAACG					
Probe M	GGCGGGGTAGGCGGCG	95 °C	15 sec	40	Tiempo	84
AQP3 FUM	GTGGAGTATTTTTTTGTAGTGGGA	60 °C	1 min		Real	
AQP3 RUM	CCCCTACCCACCAACAACA					
Probe UM	GGTGGGGTAGGTGGTG					

En la PCR multiplex se añadió un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min.
 Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies, Inc.

5.4 Análisis de Expresión Genética

La expresión genética fue evaluada y correlacionada con la metilación epigenética observada en la región promotora evaluada, utilizando cDNA transcrito de forma reversa a partir del RNA extraído de las líneas celulares, y posteriormente analizado por PCR en tiempo real y PCR convencional.

a) Aislamiento y Cultivo de Células Epiteliales de Glándula Mamaria Humana (HMEC)

Las muestras de tejido fresco de tres reducciones mamarias fueron cortadas en pequeñas porciones utilizando tijeras. Posteriormente los especímenes fueron mezclados con medio de DMEM (el cual es una modificación del medio basal de Eagle, en el cual se han aumentado la concentración de vitaminas y aminoácidos) en una proporción de 1:3 (tejido/medio) e incubados en rotación a 37 °C durante 4 hrs, con 80 mg de colagenasa (EC 3.4.24.-) y 12.5 mg de hialuronidasa (EC 3.2.1.35), ambas de Sigma-Aldrich. El tejido digerido fue cultivado en medio DMEM/F12 (Cellgro. Mediatech, Inc.) suplementado con 5% de suero de caballo, 20 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxina colérica, 0.01 mg/ml de insulina y 500 mg/ml de hidrocortisona, todas de Cambrex Charles, Inc.. Tras varios pases, se colectaron las células HMEC.

b) Aislamiento de RNA, PCR de Transcripción Reserva, PCR en Tiempo Real y PCR Convencional

i) Extracción de RNA a partir de líneas celulares

Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia, el RNA fue extraído mediante la acción lisante del reactivo Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello 1 ml del reactivo fue añadido directamente en la placa de cultivo. Una vez las células fueron desprendidas la mezcla fue transferida a un tubo eppendorf y, tras esperar 5 min, se añadieron 200 µl de cloroformo. Nuevamente se esperaron otros 5 min, se centrifugó a 11,000 rpm (a 4 °C) por 15 min y posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo (conservando la fase orgánica a -80 °C). Tras mezclar la fase acuosa con 500 µl de alcohol isopropílico se esperaron 10 min y se centrifugó a 11,000 rpm (a 4 °C) por 10 min, lavando con 1 ml de etanol al 75%. A continuación se mezcló y centrifugó nuevamente a 8,000 rpm (a 4 °C) por 5 min. Se removió el alcohol con ayuda de una pipeta y se centrifugó otro minuto para repetir el proceso de remoción alcohólica. Finalmente se dejó secar el pellet y se redisolvió con agua tratada con DEPC.

ii) PCR de transcripción reversa (RT-PCR)

Para todas las líneas celulares en las que se pretendía evaluar la expresión (incluyendo HMEC), se transcribieron de forma reversa 2 µg del RNA total en 20 µl de mezcla maestra que contenía: 200 unidades de M-MLB transcriptasa reversa (EC 2.7.7.49; Promega), 0.2 µl de dNTP 25 mM (Denville Scientific Inc.), agua DEPC y 0.5 µg cebadores oligo dT (ambos de Invitrogen Life Technologies, Inc.) de acuerdo al protocolo de síntesis de la primera hebra de cDNA del sistema M-MLB. Posteriormente, se realizó una PCR bajo las condiciones descritas en la tabla 7 utilizando 1 µl de cDNA en un volumen de reacción de 25 µl, logrando amplificar cDNA de forma semicuantitativa. El análisis de expresión genética por RT-PCR de *GAPDH* (gen constitutivo) se usó como control interno y los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para asegurar la calidad del cDNA.

iii) PCR en tiempo real

Una vez que la calidad del cDNA fue corroborada por RT-PCR, se realizó la PCR en tiempo real cuantitativa usando una reacción de 25 µl bajo las condiciones descritas en la tabla 7. La mezcla de reacción se preparó como sigue: 0.2 µl de dNTP 25 mM (Denville Scientific Inc.), 1.25 unidades de Ram Taq DNA polimerasa (Taq polimerasa; EC 2.7.7.7; Denville Scientific Inc.), 0.5 µl de cada cebador 5 µM, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.3 µl de ROX 50X, 0.025 µl de SYBR Green I 10,000X (todos de Invitrogen Life Technologies, Inc.) y 2.5 µl de buffer 10X. La PCR en tiempo real se realizó utilizando un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems Life Technologies, Inc.), y los resultados analizados usando el software SDS versión 2.1 (Austin Biodiversity), el cual usa el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para calcular el número de copias, donde $\Delta\Delta C_T$ es el nivel de señal normalizada de una muestra referido al nivel de señal normalizada en la muestra de calibración correspondiente (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las muestras fueron normalizadas a *GAPDH*, el cual se utilizó como control endógeno y la expresión fue calibrada mediante la expresión normal de HMEC.

iv) *PCR convencional*

Al concluir el tratamiento de des-metilación (detallado más adelante) el RNA de las células fue extraído, posteriormente 1 µl se transcribió de forma reversa para obtener cDNA el cual se evaluó por PCR convencional en un termociclador de calentamiento por placa (Thermo Scientific). La reacción con volumen de 25 µl se realizó bajo las mismas condiciones que la PCR en Tiempo Real (Tabla 7). La mezcla de reacción se preparó como sigue: 0.5 µl de cada cebador (5 µM, Invitrogen Life Technologies, Inc.), 0.2 µl de dNTP 25 mM, 1.25 unidades de Blue Taq DNA polimerasa (Taq polimerasa; EC 2.7.7.7; Denville Scientific Inc.), 1 µl de de MgCl₂ 50 mM y 2.5 µl de buffer 10X (todas de Denville Scientific Inc.). El análisis de expresión genética de *GAPDH* se utilizó como control interno y los productos de la PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para evaluar la efectividad del tratamiento tras 24 y 48hrs.

Tabla 7. Cebadores para el análisis de expresión genética.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR	Tiempo	Ciclos	Análisis	Tamaño (pb)
AQP3 cDNA F	GGAATAGTTTTTGGGCTGTA	94 °C	30 sec			
AQP3 cDNA R	GGCTGTGCCTATGAACTGGT	57 °C	30 sec	32/40	RT-PCR/ Tiempo Real	159
		72 °C	1 min			
GAPDH cDNA F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	94 °C	30 sec		RT-PCR/ Tiempo Real	
GAPDH cDNA R	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	57 °C	30 sec	25/40		226
		72 °C	1 min			

Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies, Inc.

c) Tratamiento con 5'-Aza-2'-Deoxicitidina (5'-Aza-CdR) y/o Tricostatina A (TSA)

La línea celular de cáncer de mama ZR7530, que presenta hipermetilación en la región que se analizó y sin expresar el gen fue incubada en el medio de cultivo RPMI con 10% de FBS a 37 °C en CO₂. Después de que las células se adhirieron a la paca de cultivo éstas fueron tratadas con 5-Aza-CdR y tricostatina A (ambas de Sigma-Aldrich), ya sea solas o en

combinación, con el fin de determinar si al desmetilar las células se recobraba la expresión genética.

Para un solo tratamiento las células fueron cultivadas en la presencia de 5'-Aza-CdR (2 y 4 μM) por 24 y 48 hrs, o TSA (100 nM) por 24 hrs. Para el tratamiento combinado, las células fueron cultivadas en la presencia de 5'-Aza-CdR (2 y 4 μM) por 24 o 48 hrs y entonces tratadas por otras 24 hrs con TSA (100 nM). Los cambios de medio se realizaron cada 24 hrs y las células se contaron con un hematocitómetro usando Trypan blue (Invitrogen Life Technologies, Inc.) como colorante de contraste. Al día siguiente las células se cosecharon y se extrajo el RNA (Figura 22).

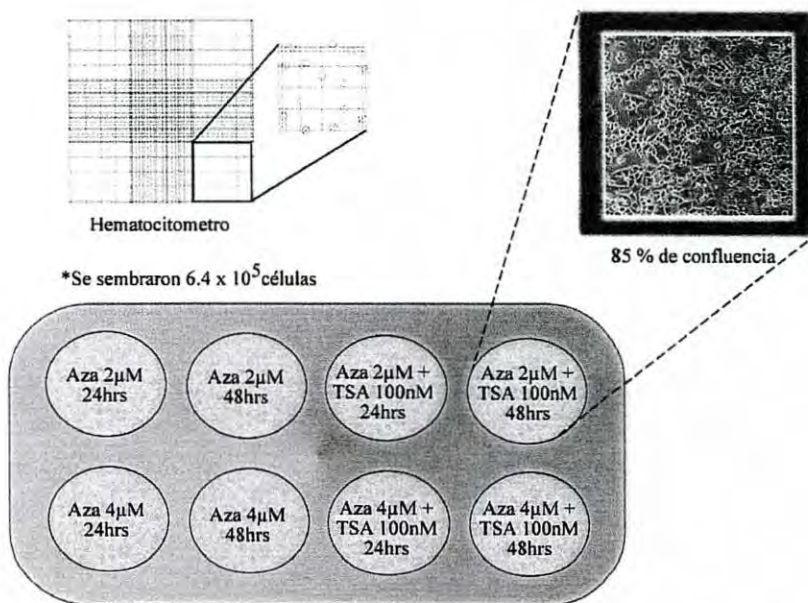


Figura 22. Condiciones del cultivo celular y tratamiento de des-metilación de la línea de cáncer de mama ZR7530.

5.5 Análisis Estadístico de los Resultados

La suma de rangos de metilación de la región promotora de los genes *AQP3* y por *PITX3* por QM-MSP y por microarreglos en 48 líneas celulares fue comparada usando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Esta prueba no paramétrica también fue utilizada para comparar la suma de rangos de metilación de ambos genes entre los subtipos de líneas

celulares y entre las líneas celulares que desarrollaron tumor cuando eran inyectadas a un ratón y las que no; así como la expresión de *AQP3* en cultivos de la línea celular ZR7530 en condiciones de metilación en *AQP3* y des-metilación.

La correlación de Spearman fue utilizada para analizar la correlación entre el análisis de metilación por el método QM-MSP y los microarreglos, así como entre la metilación en la región promotora del gen *AQP3* y su expresión genética.

El análisis de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar las medianas de metilación de *AQP3* y *PITX3* entre grupos de muestras (normal/organoides, DCIS puro, DCIS progresivo, IDC, metástasis y leucocitos). El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 y se consideraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

Los resultados del presente estudio son producto de una colaboración binacional entre el Dr. Gutiérrez Millán del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (Universidad de Sonora, Hermosillo, Son., México) y la Dra. Sukumar del centro de investigación en cáncer de mama “Sidney Kimmel Comprehensive” (Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD, EEUU), quienes facilitaron los medios para la realización de este trabajo de tesis. Así mismo los genes aquí analizados fueron encontrados (junto con muchos otros) en un estudio preliminar realizado en el laboratorio de la Dra. Sukumar al analizar por microarreglos el metiloma de un panel de 22 muestras microdisectadas.

6.1 Evaluación del Método de Análisis de Metilación Específica y Cuantitativa de Múltiples Genes por PCR en Tiempo Real (QM-MSP) en Líneas Celulares y Muestras de Tejido Microdisectadas

Como consecuencia de la necesidad de un método lo suficientemente eficiente para detectar y cuantificar de manera sensible la metilación presente en la región promotora de ambos genes fue necesario un entrenamiento en el método de análisis de metilación QM-MSP, precedido por otro de cultivo celular. Ambos tuvieron lugar en el laboratorio de la Dra. Sukumar en el centro de investigación en cáncer de mama “Sidney Kimmel Comprehensive” (Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD, EEUU).

a) Tratamiento con Bisulfito de Sodio

Después del cultivo de las líneas celulares y la extracción de su DNA, éste fue modificado químicamente con bisulfito de sodio, convirtiendo los residuos citosina no metilados en uracilo (posteriormente replicados como timina durante la PCR) mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambio (Herman *et al.*, 1996). Así mismo el DNA de la línea celular MDAMB231 fue hipermetilado *in vitro* añadiendo grupos metil enzimáticamente de S-adenosil L-metionina (SAM, EC 3.1.4.-) a una citosina en el dinucleotido CpG (Brenner

y Fuks, 2006), con el fin de usarlo como control positivo. Una vez listo el material genético, se analizó el panel de líneas celulares por el método QM-MSP.

b) Análisis de Metilación en Líneas Celulares

Con el fin de realizar una cuantificación correcta fue necesario discernir el inicio de la amplificación, seleccionando el umbral (línea verde en Figura 23) y ajustar los gráficos de DNA MDAMB231 y HSD (metilado y no-metilado, respectivamente) de manera que se sobrepongan lo más posible, al igual que los duplicados de la curva estándar (Figura 23).

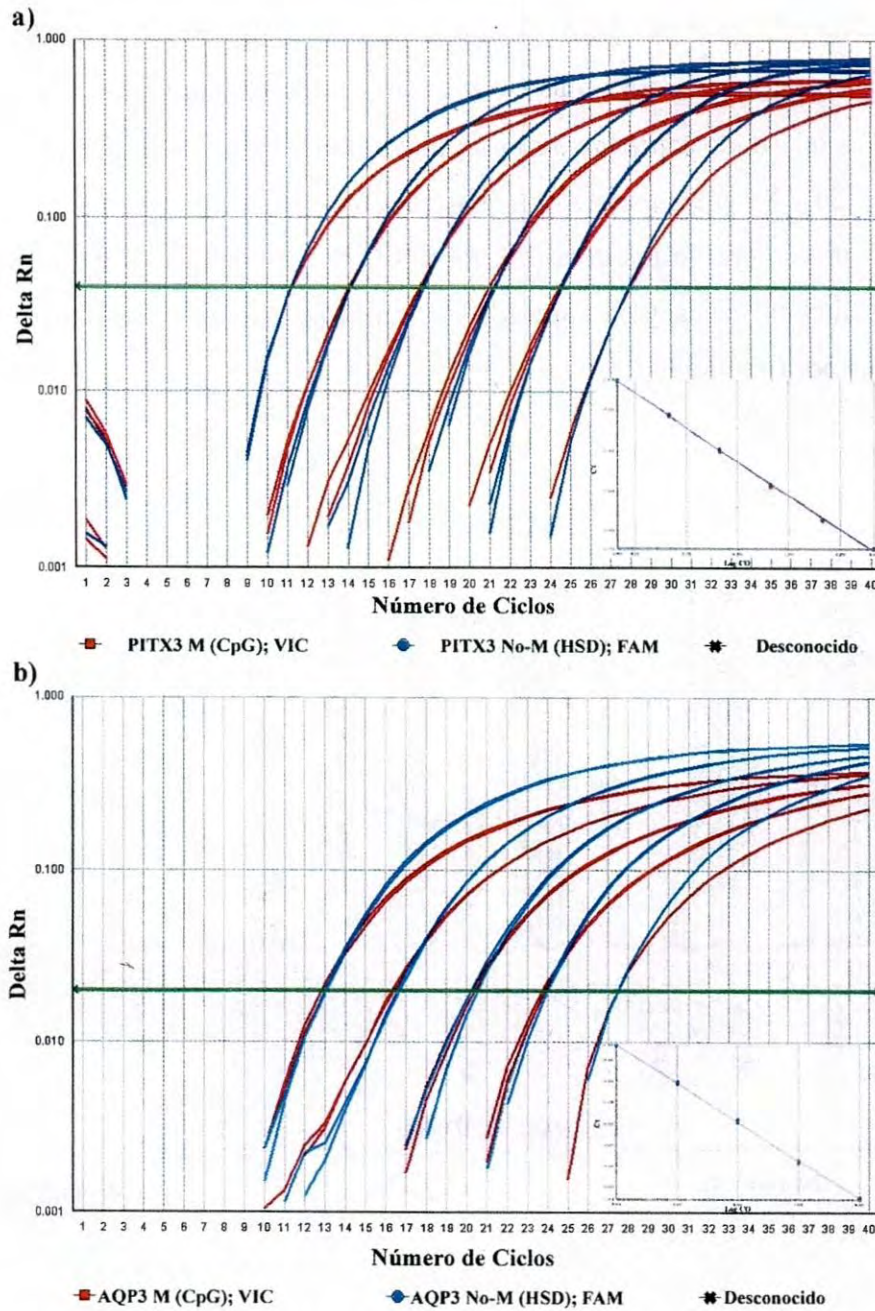
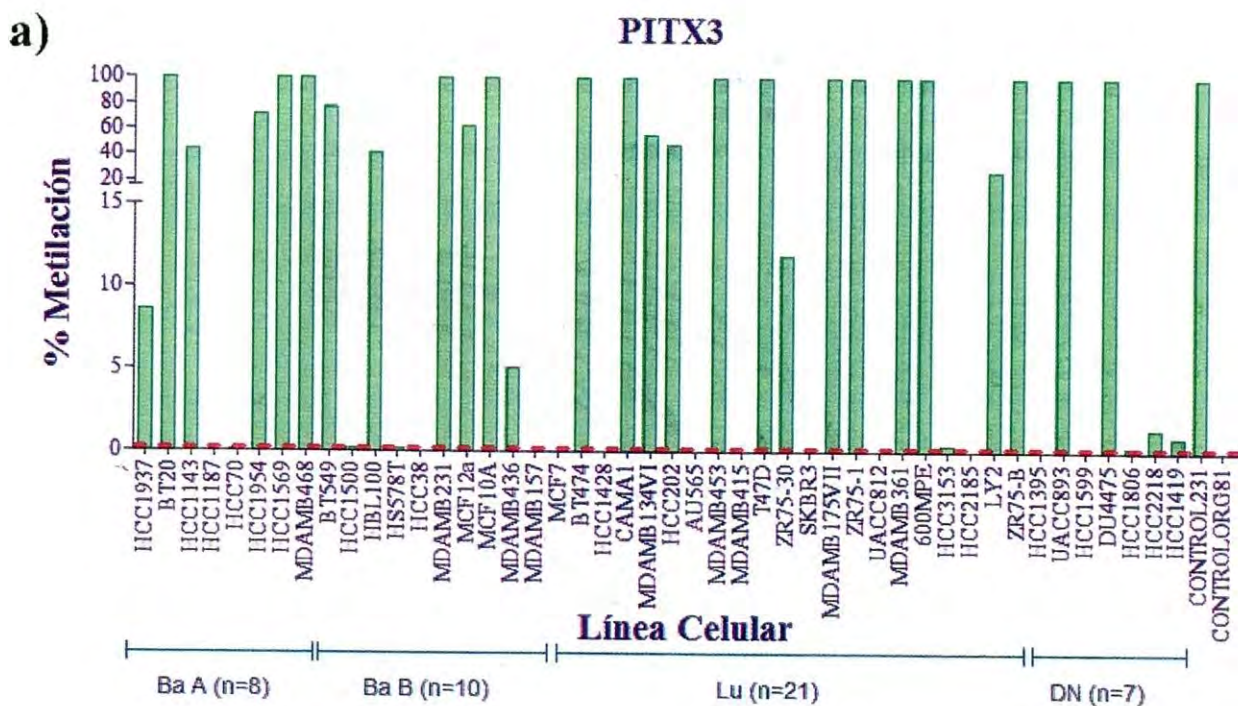


Figura 23. Curva estándar de los controles de DNA metilado y no-metilado (CpG y HSD, respectivamente).

Las curvas correspondientes al DNA metilado (M) se muestran en rojo y mientras que las del DNA no-metilado (no-M) lo hace en azul, el análisis de cada muestra se realizó por duplicado en una serie de siete diluciones seriadas de la mezcla de M+no-M con una concentración máxima de 15 ng/ μ l y el umbral (línea verde) fue designado manualmente como 0.02 Δ Rn para *AQP3* y 0.04 Δ Rn para *PITX3*. a) Curva estándar del gen *PITX3* ($MR^2 = 0.9988$; no- $MR^2 = 0.9995$); b) Curva estándar del gen *AQP3* ($MR^2 = 0.9993$; no- $MR^2 = 0.9996$).

Posterior a la cuantificación del perfil de metilación se analizaron diferencias entre subtipos celulares, así como entre aquellas líneas celulares que desarrollan tumor cuando son inyectadas en ratón y las que no, de acuerdo con lo reportado en el sitio web del laboratorio Berkeley (2009, Figura 24). Se encontró que no existe diferencia entre la metilación de las islas CpG de la región promotora de los genes *AQP3* y *PITX3* y el subtipo celular, pero sí entre la metilación de dichos genes y la capacidad de las líneas celulares de desarrollar tumores en modelos murinos ($p = 0.0236$).



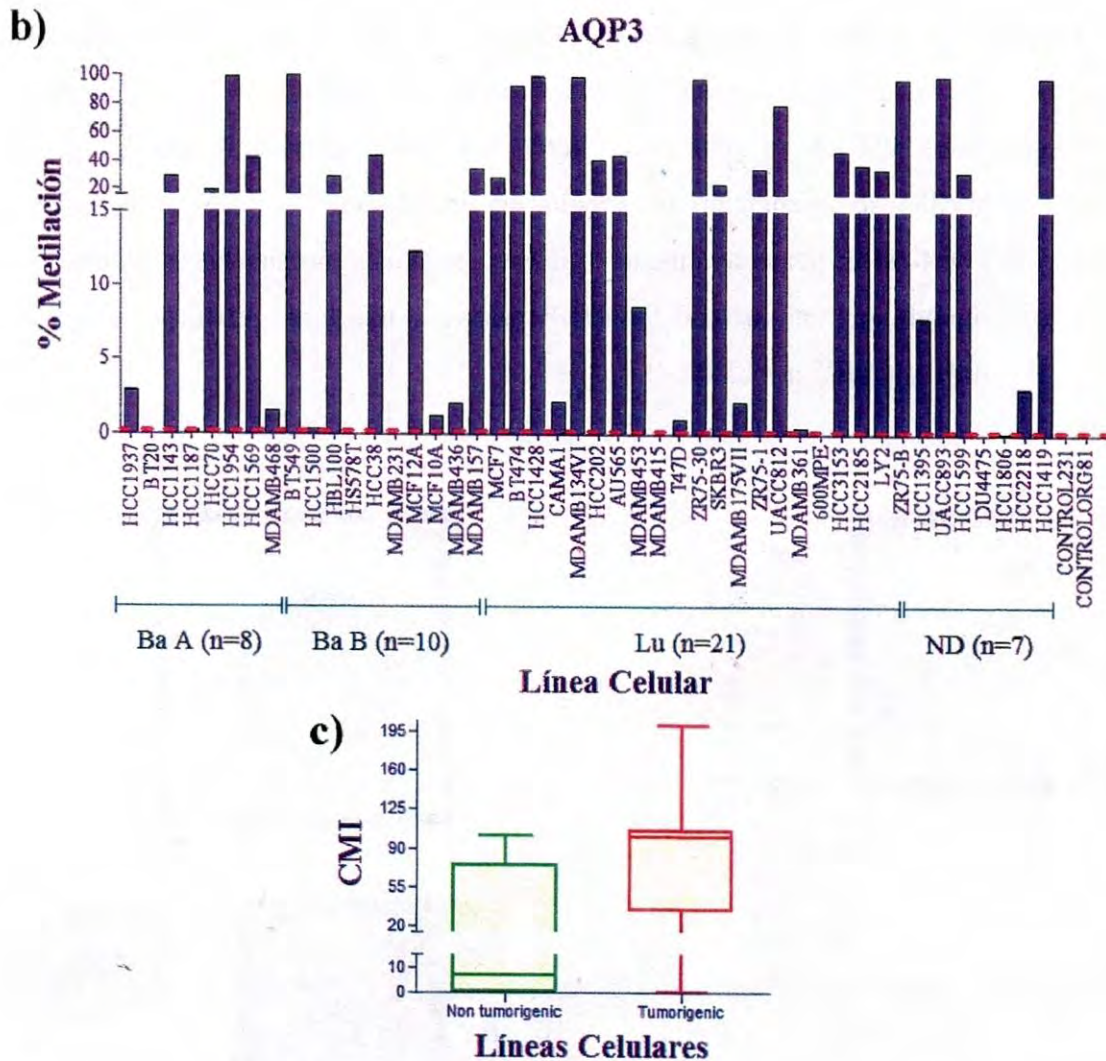


Figura 24. Perfil de metilación de líneas celulares.

El tipo celular fue clasificado por Neve, R.M., *et al.*, (Neve *et al.*, 2006) y la información de tumorigénesis fue obtenida del sitio web del laboratorio Berkeley (Berkeley-Lab, 2009). a) En diferentes subtipos celulares para *PITX3*; b) en diferentes subtipos celulares para *AQP3*; y c) índice de metilación acumulada (CMI) en líneas celulares relacionado al crecimiento de tumores xenogénicos en ratones.

c) Análisis de Metilación en Tejidos Microdisectados

De manera análoga los cebadores de la tabla 6 fueron utilizados para analizar la metilación específica y cuantitativa de los genes *AQP3* y *PITX3* por QM-MSP en las 22 muestras microdisectadas descritas en la metodología. Los resultados mostraron que los DCIS progresivo e IDC comparten el mismo patrón de metilación pero no lo hace el tejido normal adyacente o los organoides.

Después de obtener el perfil de metilación, éste fue comparado con el obtenido previamente por el grupo de investigación de la Dra. Sukumar por microarreglos, encontrando resultados similares (*PITX3*, $r = 0.8800$; y *AQP3*, $r = 0.9093$), como se puede apreciar al comparar los perfiles de metilación observados en las figuras 25 y 26, del análisis con microarreglos y QM-MSP, respectivamente. Además, se puede apreciar en la figura 25 y 26 que el perfil obtenido por el método QM-MSP presenta más bajos niveles de metilación (*PITX3*, $p < 0.0001$; y *AQP3*, $p = 0.0007$).

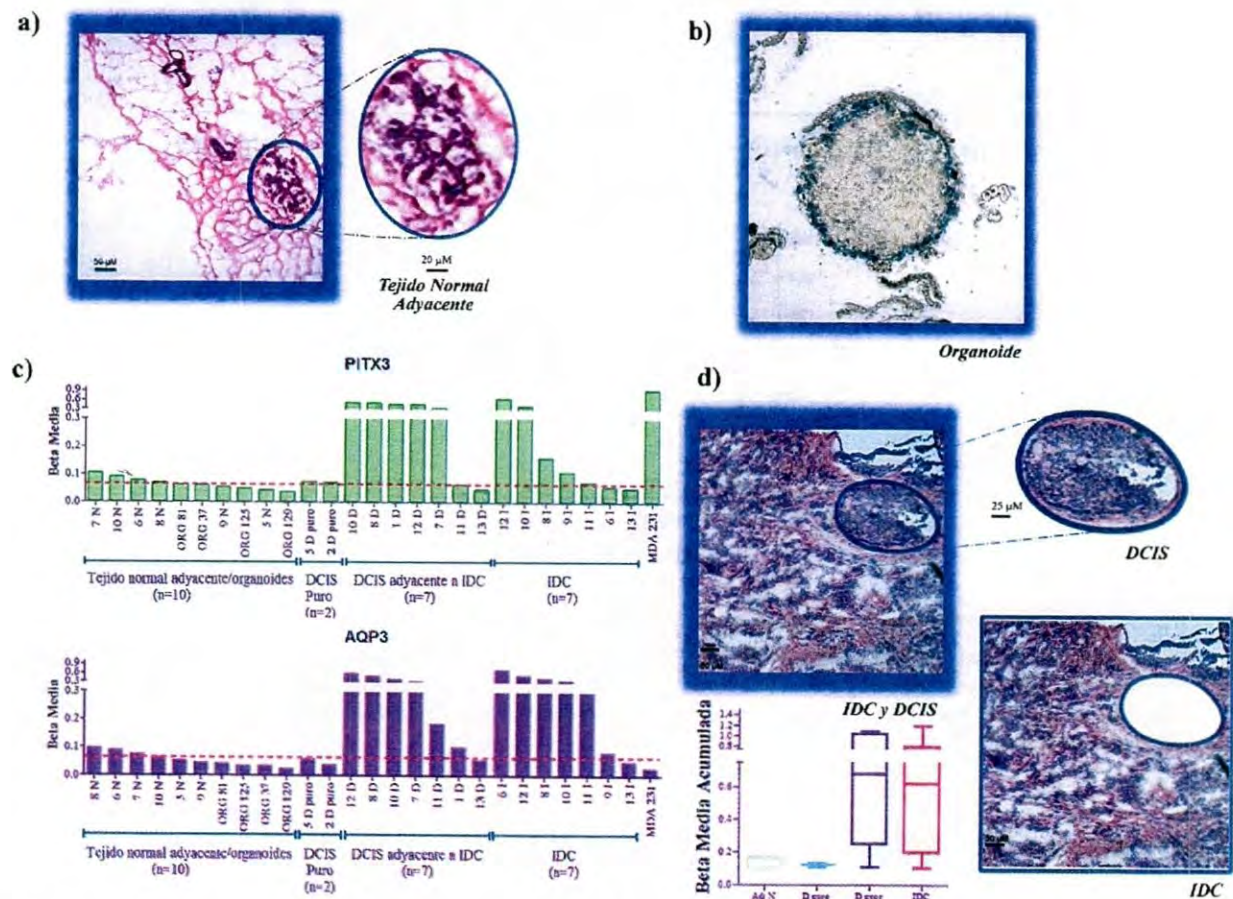


Figura 25. Lesiones sincrónicas de cáncer de secciones de tejido congelado antes de la microdissección por láser (MLD).

a) Tejido normal adyacente y organoides de tejido normal parcialmente digerido con colagenasa e hialuronidasa; b) DCIS e IDC; c) Análisis de metilación de tejido normal, DCIS, IDC y organoides por microarreglos después de MLD del tejido. La mezcla entre DCIS e IDC era evidente en otros bloques. DCIS e IDC fueron capturados por separado y dos casos fueron procesados con N, DCIS e IDC.

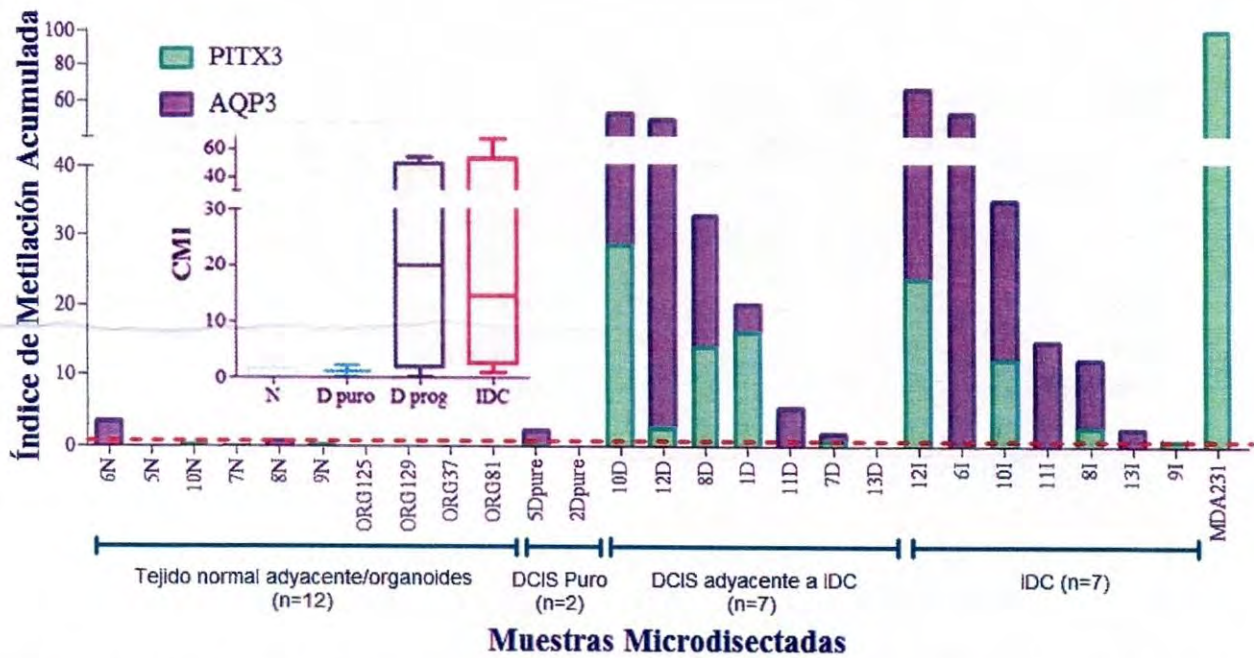


Figura 26. Índice de metilación acumulado (CMI) de muestras de tejido microdissectadas y analizadas por QM-MSP. Tejido normal adyacente (N), DCIS (D), IDC (I) y organoides (ORG). La línea celular MDABM231 (MDA231) fue utilizada como control positivo para asegurar el éxito de la reacción.

6.2 Análisis de Metilación en Muestras de Tejido

Tras validar la idea de que los DCIS progresivos e IDCs probablemente compartan características similares, al encontrarse diferencia significativa entre tejido adyacente normal y canceroso ($p = 0.0047$, Figura 26) y ninguna diferencia entre DCIS progresivo e IDC ($p = 0.8048$, Figura 26), se procedió a analizar por QM-MSP (Swift-Scanlan *et al.*, 2006), bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado anterior, un panel de 72 muestras compuesto por: 15 DCIS, 29 IDC, 13 tejidos metastásicos, 5 leucocitos (CBS), 6 tejidos normales adyacentes y 4 organoides (Tabla 8).

Tabla 8. Características de la muestras del estudio.

	<i>DCIS</i>	<i>IDC</i>	<i>Mets</i>		<i>DCIS</i>	<i>IDC</i>	<i>Mets</i>
<i>Sitio del tumor</i>				<i>Supervivencia</i>			
Mama	15	29	-	≤ 5 años	-	-	6
Ovario	-	-	1	≤ 10 años	-	-	6
Hígado	-	-	7	ND	-	-	1
Hueso	-	-	1	Marcadores Tumorales			
Abdomen	-	-	1	<i>ER</i>			
ND	-	-	3	Positivo	-	11	4
Variables Patológicas				Negativo	-	2	7
<i>Tamaño del tumor</i>				ND	15	16	2
T ≤ 2 cm	-	5	4	<i>PR</i>			
T 2.1 - 4.9 cm	-	17	4	Positivo	-	16	2
T > 5 cm	-	5	3	Negativo	-	10	9
ND	15	2	2	ND	15	3	2
<i>Grado tumoral</i>				<i>HER2</i>			
grado 1	-	1	-	Positivo	-	5	-
grado 2	10	4	4	Negativo	-	12	-
grado 3	3	3	7	ND	15	12	13
ND	2	21	2	<i>Ki67</i>			
<i>Nódulos linfáticos metastásicos</i>				Positivo	-	4	-
Positivo	-	22	7	Negativo	-	8	-
Negativo	-	4	4	ND	15	17	13
ND	-	3	2	Normal (6)/organoides (4)/leucocitos (5)			

ND = No determinado.

a) PCR multiplex de Muestras de Tejido

Después de extraer el DNA de las muestras y proceder a su subsecuente modificación química se procedió al análisis por QM-MSP, para lo cual se realizó una PCR multiplex con el fin de obtener suficiente cantidad de muestra para el posterior análisis de metilación por PCR en tiempo real. Tras correr los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% se estimó a simple vista, como se ejemplifica en la figura 27, el factor de dilución necesario previo al análisis por PCR en tiempo real.



Figura 27. Electroforesis en gel de los productos de la PCR multiplex de los genes *AQP3* y *PITX3*.

Gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR multiplex tras una dilución 1:5 de las muestras iniciadas en INH, utilizando como marcador de peso molecular el marcador 123bp (pares de bases, Sigma-Aldrich).

b) PCR en Tiempo Real de Productos de PCR multiplex

Los resultados de la PCR en tiempo real de los tumores primarios mostraron una diferencia entre el tejido normal adyacente y lesiones de carcinomas ($p = 0.0348$); ninguna diferencia entre tejido normal adyacente y leucocitos ($p = 0.5135$); y entre DCIS, IDC y metástasis ($p = 0.3238$, véase Figura 28).

Pensando en la posibilidad de predecir el riesgo de metástasis distante a partir de tumores primarios se analizó por QM-MSP (Swift-Scanlan *et al.*, 2006) un segundo panel de 72 muestras compuesto por: 44 tumores primarios (15 DCIS y 29 IDC), 13 tejidos metastáticos, 5 leucocitos (CBS), 6 tejidos normales adyacentes y 4 organoides (Figura 28). Los resultados del análisis mostraron una diferencia entre el tejido normal adyacente y lesiones de carcinomas ($p = 0.0348$). Del mismo modo los leucocitos de sujetos normales mostraron una frecuencia de metilación de cero es decir su estado es no-metilado, eliminando de este modo la posibilidad de que la metilación observada en las regiones promotoras de los genes *PITX3* y *AQP3* fuera producto de la respuesta inflamatoria al cáncer de mama (Figura 28). Sin embargo, aun cuando no se encontraron diferencias significativas entre DCIS ($f_i = 0.20$), IDC ($f_i = 0.55$) y metástasis ($f_i = 0.46$) con un valor de $p = 0.3238$, algunos casos no presentaron metilación en estos genes y no fue posible probar la hipótesis de que la metilación en las islas CpG de la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* podrían ser utilizada

como un indicador de la habilidad de un carcinoma *in situ* de progresar a carcinoma invasivo, véase Figura 28.

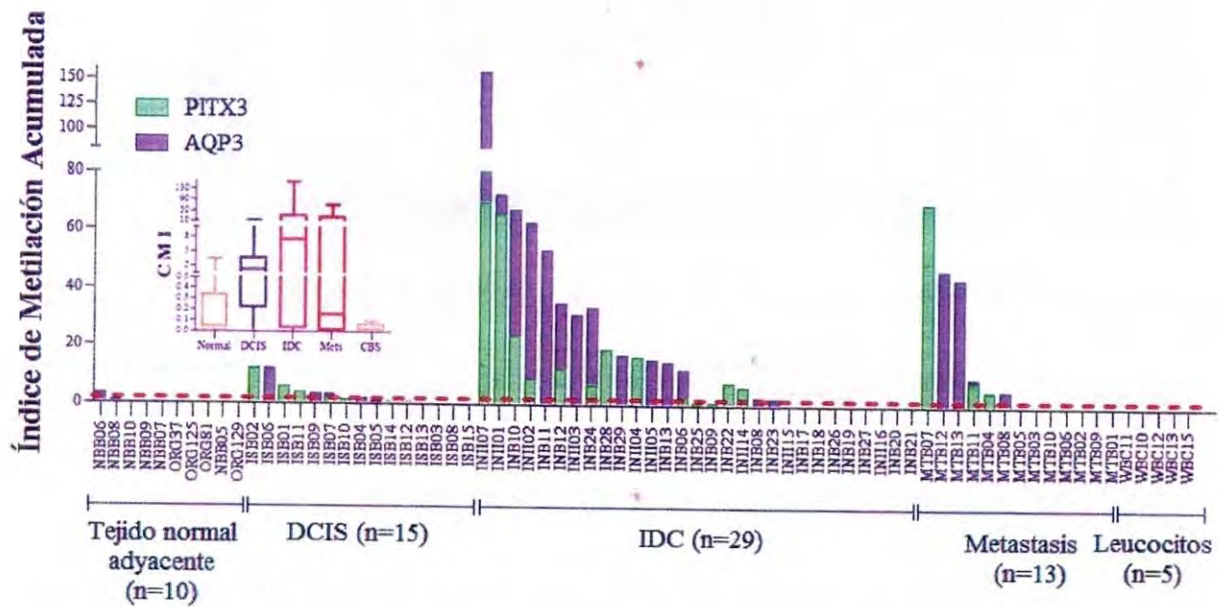


Figura 28. Índice de metilación acumulado (CMI) de muestras de tejido y analizadas por QM-MSP.

Tejido normal adyacente y organoides (ORG), DCIS, IDC, tejido metastásico (Mets) y leucocitos (CBS).

Además, en este estudio el 17% de las muestras analizadas pertenecían a pacientes mexicanas y fueron etiquetadas como INH, por ser un carcinoma invasivo procedente de la ciudad de Hermosillo. Así mismo, el 43.75% de los casos analizados que presentaron metilación en al menos uno de los genes corresponde a pacientes mexicanas, con una f_i de 0.78.

6.3 Análisis de la Regulación de la Expresión Genética

a) Evaluación de la Expresión Relativa de Líneas Celulares

Ya que la metilación del DNA es un mecanismo epigenético que puede mediar la silenciamiento genética, determinamos además si la expresión de mRNA estaba alterada debido a hipermetilación en *AQP3*. Esto se hizo mediante el análisis por PCR en tiempo real de 18 líneas celulares: 6 con metilación baja o no detectable, 6 con niveles medios de metilación y 6

con altos niveles de metilación en la región promotora del gen *AQP3*; adicionalmente, 3 células epiteliales de glándula mamaria humana (HMEC) fueron cultivadas y usadas en representación de células normales (Figura 29). Para este análisis incluimos además un control positivo y negativo (cDNA de MDAMB231 y el RNA extraído de la misma línea celular y sin transcriptasa reversa, respectivamente) donde *AQP3* se encontró altamente expresado durante la optimización de las condiciones de PCR (cualquier otra línea celular de la figura podría haber sido seleccionada, véase Figura 30). Los resultados de este análisis mostraron una clara diferencia en la expresión relativa de líneas celulares metiladas y no-metiladas ($p = 0.0100$), además de una correlación inversa entre expresión y metilación ($r = -0.5276$, Figura 29).

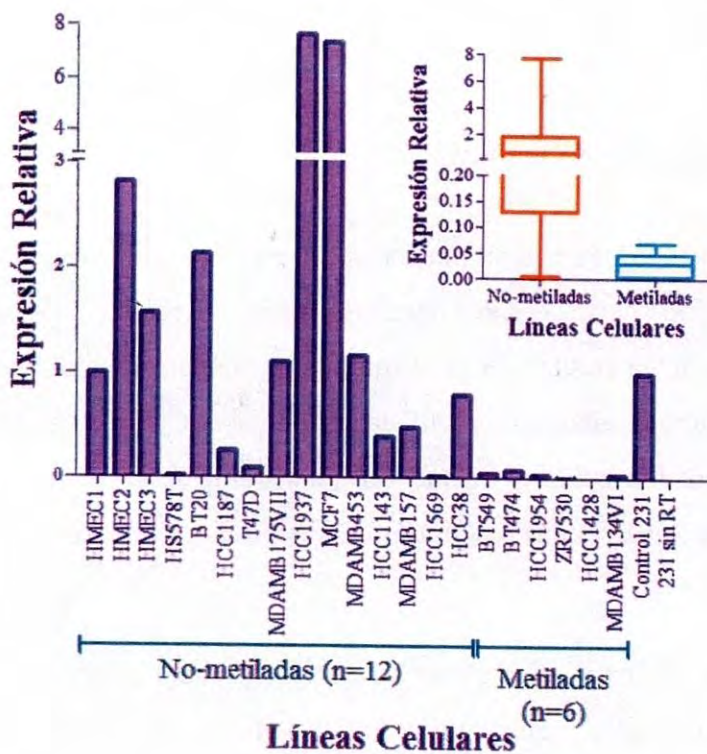


Figura 29. Expresión relativa del gen *AQP3* en líneas celulares con la región promotora del gen no-metilado y metilado.

Los controles positivo y negativo corresponden a cDNA de MDAMB231 (etiquetado como 231) y el RNA extraído de la misma línea celular y sin transcriptasa reversa, respectivamente.

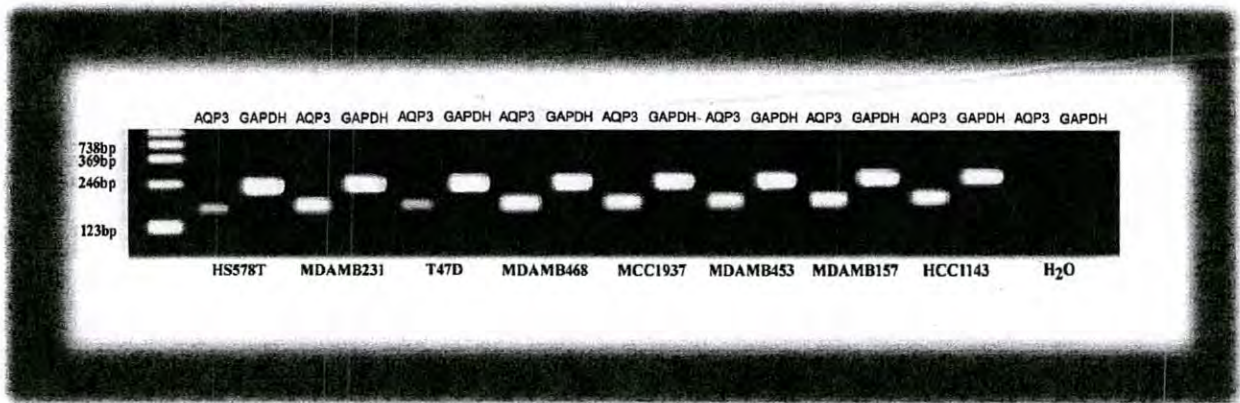


Figura 30. Electroforesis en gel de los productos de la PCR de transcripción reversa de los genes *AQP3* y *GAPDH* en varias líneas celulares.

Gel de agarosa al 2%, el gen constitutivo *GAPDH* fue usado para contrastar la expresión de *AQP3* y el marcador 123 pb fue utilizado como marcador de peso molecular.

b) Tratamiento Desmetilador en la Línea Celular ZR7530

Debido a que genes metilados y sin expresión pueden recuperar su expresión a través de un tratamiento de des-metilación con agentes como 5 azadeoxicidina, se realizó un ensayo de des-metilación *in vitro* usando la línea celular ZR7530 (que en el análisis general que se muestra en la figuras 24b fue encontrada altamente metilada en las islas CpG de la región promotora del gen *AQP3* y con expresión nula del mismo gen tal y como se ve en la figura 29). Esto se hizo para explorar si la línea celular recobra la expresión de *AQP3* tras la des-metilación del DNA (Figura 22).

Después del tratamiento por 24 hrs y 48 hrs con el fármaco desmetilador (5'-Aza-CdR), ZR7530 recobra la expresión de *AQP3*, como se muestra en la figura 31. Allí se puede ver que tras el tratamiento con 5'-Aza-CdR el gen recupera la expresión (sin tener un incremento sustancial al aumentar la concentración del fármaco) y que después de añadir el fármaco desacetilador (TSA) la expresión aumenta significativamente. Además podemos observar que la recuperación de la expresión es mayor tras 48 hrs de tratamiento.

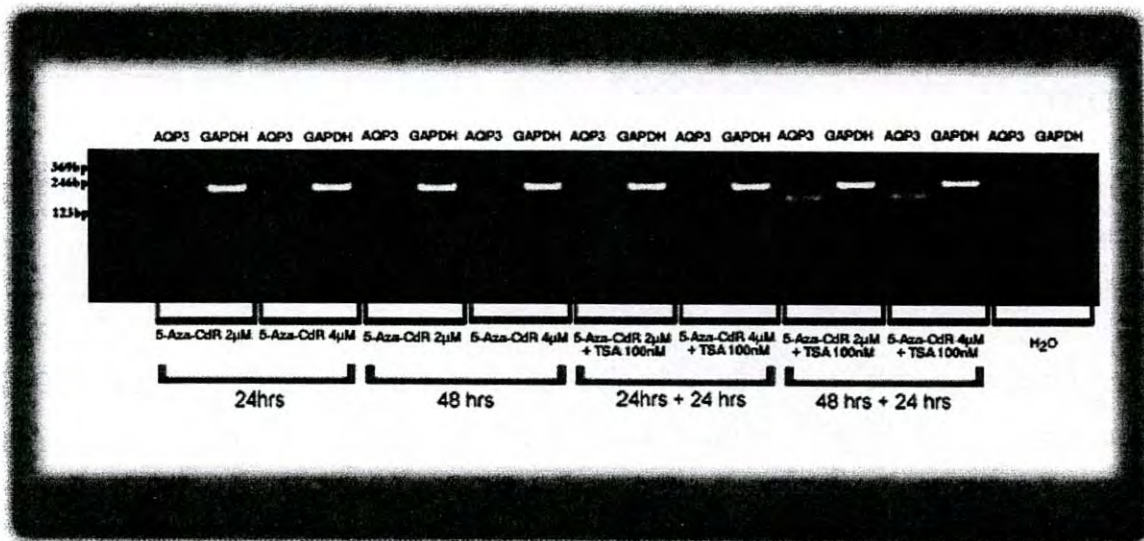


Figura 31. Electroforesis en gel de los productos de la PCR de transcripción reversa de los genes *AQP3* y *GAPDH* de la línea celular ZR7530 tras el tratamiento desmetilador. Gel de agarosa al 2%, el gen constitutivo *GAPDH* fue usado para contrastar la expresión de *AQP3* y el marcador 123 pb fue utilizado como marcador de peso molecular. El tratamiento desmetilador consistió en administrar los fármacos 5'-Aza-CdR (2 y 4 μM) y TSA (100 nM) solos o en combinación tras RT-PCR.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Evaluación del Método de Análisis de Metilación Específica y Cuantitativa de Múltiples Genes por PCR en Tiempo Real (QM-MSP) en Líneas Celulares y Muestras de Tejido Microdisectadas

En el último par de décadas se ha demostrado que la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras de genes es un evento común y temprano en carcinogénesis, incluyendo cáncer de mama (Esteller, 2007; Lo y Sukumar, 2008; Agrawal *et al.*, 2007; Egger *et al.*, 2004; Jones y Baylin, 2002), además de estar asociado frecuentemente con supresión de la expresión genética mediante un proceso llamado silenciación epigenética (Esteller, 2008; Herman y Baylin, 2003; Baylin y Herman, 2000; Jones y Baylin, 2002). Esto ha hecho de la metilación en el DNA un atractivo paradigma para la detección de cáncer a través de metilación genética diferencial entre tejido normal contra tejido tumoral (Visvanathan *et al.*, 2006).

Como se ha revisado en el apartado de heterogeneidad del cáncer de mama, el cáncer de mama con peor pronóstico corresponde al subtipo tipo-basal, mismo que hasta la fecha puede ser identificado con paneles de marcadores inmunohistoquímicos, como ER-PR-HER2 negativos algunas veces llamados “fenotipo triples negativo” (TNP) (Haffty *et al.*, 2006) o más recientemente como ER/PR/HER2-negativo y EGFR/Citoqueratina 5/6-positivo, lo que es de utilidad al pronosticar la supervivencia de pacientes (Cheang *et al.*, 2008). Sin embargo, continúa siendo necesaria una clasificación molecular más fina, para lo que se requieren nuevos biomarcadores que ayuden a determinar si el cáncer de mama pertenece al subtipo tipo-basal, donde las pacientes podrían estar recibiendo quimioterapia insuficiente (Gradishar, 2005; Neve *et al.*, 2006).

Con lo anterior en mente se decidió analizar la metilación de la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* en un panel de líneas celulares y determinar si podrían ser usados para distinguir entre subtipos tipo-basal y luminal de cáncer de mama. El análisis de la expresión genética de las líneas celulares de cáncer de mama ha mostrado modelar el cáncer

de mama y pueden ser subdividida en los mismos subtipos, por ello decidimos probar nuestra hipótesis primero en DNA proveniente de estas líneas celulares. Además, la hipermetilación de las regiones promotoras puede ser más fácilmente cuantificada y con mayor precisión en líneas celulares, ya que los cultivos celulares no están contaminados por células epiteliales o no epiteliales normales que podrían enmascarar las alteraciones específicas del tumor (Neve *et al.*, 2006).

En este estudio no se encontró correlación entre el subtipo celular y la metilación en las islas CpG de la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3*. Ambos genes se encuentran metilados en todos los tipos celulares, por lo que no pueden ser utilizados como biomarcadores para incrementar la sensibilidad de clasificación del cáncer de mama celular y continúan siendo necesarios marcadores moleculares para diferenciar los subtipos celulares que componen el cáncer de mama. Así mismo, se debe tener en cuenta que dicha clasificación fue realizada en base a la expresión genética (Neve *et al.*, 2006) y probablemente presente variaciones en un futuro cuando se realice la clasificación epigenética.

Por otro lado, al comparar la suma de rangos de metilación en la región promotora del gen *AQP3* en líneas celulares relacionado al crecimiento de tumores xenograftos en ratones se encontró un patrón de metilación diferente entre las líneas celulares que desarrollaron tumor cuando eran inyectadas en ratón y las que no ($p = 0.0236$), de acuerdo con lo reportado en el sitio web del laboratorio Berkeley (2009). Lo anterior sugiere la posibilidad de que estos genes participaban en el desarrollo del tumor o cuando menos propiciaban la invasión de las líneas celulares; ya que debe tenerse presente que no se realizó el ensayo de invasión, sino que el análisis se basó en lo reportado en la bibliografía.

El análisis de metilación en la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* no se limitó a su uso como marcadores de subtipo celular, sino que se abordó la hipótesis de que la metilación en la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* podría ocurrir de forma selectiva en los DCIS que progresaran a tumores invasivos, y en tumores primarios que tienen el potencial de metastatizar en un futuro. Esto con base en los resultados obtenidos por el grupo de investigación de la Dra. Sukumar, quienes encontraron que tanto *PITX3* como *AQP3* se encontraban no-metilados en DCIS puro pero metilados en DCIS progresivo e IDC (en una

proporción cinco veces mayor). Los resultados del análisis mostraron diferencia significativa entre la metilación del tejido normal adyacente y el tejido canceroso, y ninguna diferencia entre DCIS progresivo e IDC.

Por su parte, el análisis posterior de las mismas muestras por QM-MSP arrojó resultados similares, lo que concuerda con el modelo de progresión en el que ocurren alteraciones moleculares en el epitelio del seno de las unidades lobulares del ducto terminal normal resultando en hiperplasia (atípica). Las alteraciones moleculares subsecuentes pueden ocurrir resultando en DCIS y en caso de ocurrir eventos adicionales el daño puede resultar en un IDC.

Ya que no todos los DCIS muestran metilación en la región promotora de estos genes, sino sólo aquellos que fueron microdisectados de pacientes con IDC adyacente, estos resultados sugirieron que aquellos DCIS con metilación en los genes *PITX3* y *AQP3* podrían progresar a carcinomas invasivos. Estas aportaciones prometen un método fiable para discernir entre mujeres con DCIS que deben someterse a tratamiento quimiopreventivo y las que no, así como predecir la presencia de IDC en las pacientes. Son muchas las pacientes que tras uno o varios años del diagnóstico con DCIS reciben la terrible noticia de que desarrollaron IDC; si bien el cuidado estándar recomienda la revisión continua de las mamas, éste no puede predecir si la paciente desarrollará la enfermedad neoplásica maligna o en qué momento.

Dietrich y colaboradores analizaron anteriormente la metilación del gen *PITX3* en varias muestras de tejido mamario microdisectado, sin encontrar una diferencia significativa entre tejido normal y canceroso, sin embargo en su estudio ellos analizaron una región diferente a la evaluada en este trabajo (Dietrich *et al.*, 2009). Además, no se puede descartar la posibilidad de que la metilación en el gen *PITX3* no sea un hecho común en el 100 por ciento de los casos de cáncer de mama, como ocurre en el caso del los genes *BRCA*, *p53* o *HER2*. Por su parte, la metilación en el gen *AQP3* es reportada en este trabajo por primera vez.

Además se comparó el perfil de metilación obtenido por QM-MSP con el obtenido previamente por microarreglos, encontrándose una correlación alta entre los perfiles de metilación arrojados por ambos análisis. Sin embargo, el perfil obtenido por el método QM-

MSP presentó más bajos niveles de metilación tanto por QM-MSP como por microarreglos y así mismo se puede apreciar como, además de ser más amplia la región analizada por QM-MSP, es necesario que se unan específicamente tres cebadores (incluyendo la sonda) para que el detector reconozca la señal del reportero, lo cual es conveniente para la práctica clínica pues el método es suficientemente sensible para semejar el perfil de metilación obtenido por microarreglos, pero lo suficientemente estricto para detectar metilación con relevancia clínica. Por tanto estos resultados respaldan la aplicación del método QM-MSP como herramienta para el análisis de metilación genética en pruebas de diagnóstico y/o pronóstico.

7.2 Análisis de Metilación en Muestras de Tejido

Las posibilidades de supervivencia de una persona dependen primordialmente de la celeridad con que sea descubierta la enfermedad, puesto que mientras más tiempo pase más se diseminan las células cancerosas por el cuerpo y es más difícil eliminarlas. Así, es factible predecir el desarrollo de IDC si se parte de la idea de que la progresión del tumor sea el resultado de cambios genéticos y epigénéticos inestables en un ambiente siempre cambiante, entre las células cancerosas que fueron seleccionadas por evolución y expansión clonal a través del tiempo de los tumores de comportamiento más agresivo (Merlo *et al.*, 2006).

La frecuencia de metilación de IDC ($f_i = 0.55$) y los tejidos metastásicos ($f_i = 0.46$) incluidos en este estudio respalda el uso de *AQP3* y *PITX3* como biomarcadores, aunque también sugiere que es necesario agregar uno o más marcadores al panel. Probablemente si se incrementara el tamaño de muestra y se dividiera en grupos usando variables patológicas como el estado de los nódulos linfáticos o el grado del tumor se lograría aclarar el por qué unos casos de IDC y tejido metastático presentan metilación y otros no. Si esta metilación es detectada en estadios tempranos de la enfermedad (como DCIS), podría ser usada como pronóstico y vigilancia de pacientes independientemente del estado de la enfermedad, ya que la evaluación del estadio sólo provee información respecto al tumor al momento en que la biopsia fue colectada (Fabbri *et al.*, 2008) y el estado de metilación podría aportar información referente a la invasión.

Así mismo, es posible que la metilación en las islas CpG en la región promotora de los genes analizados en este estudio se observe con mayor frecuencia en las pacientes mexicanas debido a la exposición a un factor ambiental que modifica el patrón de metilación en la población mexicana, pero que influye en menor medida en la población estadounidense.

7.3 Análisis de la Regulación de la Expresión Genética

La evaluación de la metilación en las islas CpG en la región promotora como mecanismo epigenético mediador de la silenciación genética mostró diferencia de la expresión relativa del gen *AQP3* en líneas celulares metiladas y no metiladas y una correlación inversa entre el estado de metilación del gen y su expresión. Estos resultados sugieren que la expresión de este gen es regulada epigenéticamente por metilación, específicamente en el área promotora evaluada, lo cual fue corroborado al realizar el tratamiento de desmetilación. Además, el hecho de que las células epiteliales de la glándula mamaria humana (normales) presentaran expresión del gen *AQP3* (sin metilación en su región promotora) sugiere que la proteína AQP3 podría jugar un papel importante en el seno normal y su pérdida estar ligada a la invasión en cáncer de mama. Esta suposición se basa en que el análisis de metilación de DCIS, IDC y tejido metastásico mostró metilación y se puede inferir una pérdida de expresión, mientras que en tejido normal adyacente y organoides no se encontró metilación alguna o ésta fue muy baja. Aunque son necesarios estudios futuros a gran escala es importante destacar que este trabajo reporta por primera vez la expresión del gen *AQP3* en HMEC que derivan directamente de células lumbinales de tejido mamario sano.

VIII. CONCLUSIONES

- Se demostró que el método de análisis múltiple de metilación específica y cuantitativa por PCR en tiempo real (QM-MSP) puede reflejar en una forma cuantitativa el estado de metilación de muestras de tejido y líneas celulares, y que esta metilación se correlaciona con los resultados obtenidos por microarreglos.
- La metilación de los genes *PITX3* y *AQP3* no puede ser usada como biomarcador de subtipo celular, ya que no se encontró correlación entre el subtipo celular y la metilación de la región promotora de dichos genes.
- La metilación de los genes *PITX3* y *AQP3* en tejido microdisectado mostró ser útil para diferenciar entre el tejido normal adyacente y el tejido canceroso y puede diferenciar entre los DCIS que progresarán a IDC y los que no.
- No fue posible demostrar que la metilación en la región promotora de los genes *PITX3* y *AQP3* podría ocurrir de forma selectiva en los DCIS que progresaran a tumores invasivos, y en tumores primarios que tienen el potencial de metastatizar en un futuro.
- El análisis de metilación de las islas CpG en la región promotora de *AQP3* entre líneas celulares metiladas y no metiladas demostró estar correlacionado con la expresión genética.
- La expresión genética del gen *AQP3* es regulada epigenéticamente por metilación, específicamente en el área promotora evaluada.

IX. RECOMENDACIONES

Debe continuarse la búsqueda de alteraciones en la metilación epigenética del DNA puesto que éstas se encuentran entre los biomarcadores candidatos más prometedores. Así mismo, es necesario estudiar las múltiples alteraciones epigenéticas en el cáncer de mama con el fin de comprender su heterogeneidad molecular y el gran número de genes involucrados en la invasión celular. A su vez es factible un estudio donde se correlacione la metilación de un panel de genes (el cual podría incluir no sólo los genes *PITX3* y *AQP3* sino también *TWIST*, *RASSF1A* y *HIN1*) con algunos de los factores de riesgo del cáncer de mama, puesto que la epigenética es el lenguaje entre el medio ambiente y los cambios fenotípicos.

Es necesaria la validación *in vitro* de nuevos marcadores de subtipo celular antes de su aplicación en la clasificación de cánceres mamarios, si bien los genes *PITX3* y *AQP3* no demostraron ser eficientes en dicho fin aún es necesario realizar una clasificación epigenética de los subtipos celulares. El método ideal para abordar la problemática anterior sería un análisis por microarreglos del metiloma de cada subtipo celular pues esto arrojaría miles de genes candidatos de utilidad para la diferenciación de subtipos celulares, que posteriormente podrían ser validados por el método de análisis de metilación específica y cuantitativa de múltiples genes por PCR en tiempo real (QM-MSP). En adición en este estudio se corroboró la eficiencia del método QM-MSP y se recomienda como herramienta de análisis en futuras investigaciones para el análisis no sólo muestras tejido sino todo tipo de fluidos biológicos.

Es recomendable llevar a cabo un estudio de pacientes con DCIS, donde el tamaño de muestra se incremente y las pacientes se clasifiquen en grupos de acuerdo a variables patológicas como el estado de los nódulos linfáticos o el grado del tumor. También sería importante evaluar el perfil de metilación de los genes *PITX3* y *AQP3* en aquellos que progresaron a IDC y los que no, así como un estudio con enfoque en pacientes mexicanas. Además sería de utilidad el añadir nuevos genes al panel de marcadores, todo ello con el fin de estandarizar un método que permita detectar cambios patológicos en ensayos independientes de observación, lo que tiene ventajas obvias para la práctica clínica. Por último, se sugiere

realizar investigación de ciencia básica para descubrir la función en el tejido mamario normal y canceroso de los genes *PITX3* y *AQP3*, con el fin de descubrir la alteración que causa su hipermetilación, ya que no se encontró ningún reporte en la literatura y los resultados de este trabajo sugieren que la proteína *AQP3* podría jugar un papel importante en el seno normal y su pérdida estar ligada a la invasión en cáncer de mama.

X. LITERATURA CITADA

- AAFP (2002). Screening for breast cancer: recommendations and rationale. *Am Fam Physician*, Vol. 65, No. 12, pp. 2537-44.
- Adams, R.H. & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 8, No. 6, pp. 464-78.
- Agami, R. & Bernards, R. (2002). Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Lett*, Vol. 177, No. 2, pp. 111-8.
- Agrawal, A., Murphy, R.F. & Agrawal, D.K. (2007). DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol*, Vol. 20, No. 7, pp. 711-21.
- Ahearne P.M., Leanch S.D. & B.W., F. (2000). Cáncer de mama invasivo. En: *MD Anderson Oncología*. 2da edn. Madrid: Marbán Libros. pp. 13-37.
- Ahlgren, S. (2008). Selected protocols. En: *Methods in Cell Biology*. Bronner-Fraser, M. (Ed.) 2da edn. San Diego, CA: Elsevier's Science & Technology. pp. 156-164.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, No. 7, pp. 3983-8.
- Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W.R. & Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, Vol. 6, No. 1, pp. 17-32.
- Allred, D.C., Brown, P. & Medina, D. (2004). The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res*, Vol. 6, No. 6, pp. 240-5.
- Allred, D.C., Mohsin, S.K. & Fuqua, S.A. (2001). Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*, Vol. 8, No. 1, pp. 47-61.
- Anderson, E., Clarke, R.B. & Howell, A. (1998). Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 3, No. 1, pp. 23-35.
- Anderson, T.J., Ferguson, D.J. & Raab, G.M. (1982). Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer*, Vol. 46, No. 3, pp. 376-82.
- Anónimo (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, Vol. 358, No. 9291, pp. 1389-99.
- Anónimo (2002). Chemoprevention of breast cancer: recommendations and rationale. *Ann Intern Med*, Vol. 137, No. 1, pp. 56-8.
- Asselin-Labat, M.L., Shackleton, M., Stingl, J., Vaillant, F., Forrest, N.C., Eaves, C.J., Visvader, J.E. & Lindeman, G.J. (2006). Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, No. 14, pp. 1011-4.
- ATCC (2009). Tumor cell lines by disease. Disponible en: <http://www.atcc.org/Portals/1/TumorLines.pdf>.

- Baines, C.J., Miller, A.B., Wall, C., McFarlane, D.V., Simor, I.S., Jong, R., Shapiro, B.J., Audet, L., Petitclerc, M. & Ouimet-Oliva, D. (1986). Sensitivity and specificity of first screen mammography in the Canadian national breast screening study: a preliminary report from five centers. *Radiology*, Vol. 160, No. 2, pp. 295-8.
- Ballestar, E., Paz, M.F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M.F., Espada, J., Cigudosa, J.C., Huang, T.H. & Esteller, M. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J*, Vol. 22, No. 23, pp. 6335-45.
- Banerjee, S., Reis-Filho, J.S., Ashley, S., Steele, D., Ashworth, A., Lakhani, S.R. & Smith, I.E. (2006). Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*, Vol. 59, No. 7, pp. 729-35.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C. & Weinberg, R.A. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, Vol. 45, No. 5, pp. 649-57.
- Barnes, M.J., Taylor, G.A. & Newell, D.R. (2000). Development of a whole cell assay to measure methotrexate-induced inhibition of thymidylate synthase and de novo purine synthesis in leukaemia cells. *Biochem Pharmacol*, Vol. 59, No. 4, pp. 321-8.
- Barsky, S.H. (2003). Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Exp Mol Pathol*, Vol. 74, No. 2, pp. 113-22.
- Barsky, S.H. & Karlin, N.J. (2005). Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 10, No. 3, pp. 249-60.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y.M. & Mendelsohn, J. (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*, Vol. 58, No. 13, pp. 2825-31.
- Baum, M. (2002). The ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) adjuvant breast cancer trial in postmenopausal patients: factors influencing the success of patient recruitment. *Eur J Cancer*, Vol. 38, No. 15, pp. 1984-6.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, Vol. 16, No. 4, pp. 168-74.
- Baylin, S.B. & Ohm, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, No. 2, pp. 107-16.
- Beacham, D.A. & Cukierman, E. (2005). Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*, Vol. 15, No. 5, pp. 329-41.
- Bell, S.P. & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, Vol. 71, pp. 333-74.
- Bellon, J.R., Shulman, L.N., Come, S.E., Li, X., Gelman, R.S., Silver, B.J., Harris, J.R. & Recht, A. (2004). A prospective study of concurrent cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil and reduced-dose radiotherapy in patients with early-stage breast carcinoma. *Cancer*, Vol. 100, No. 7, pp. 1358-64.
- Benaud, C., Dickson, R.B. & Thompson, E.W. (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 50, No. 2, pp. 97-116.

- Benedek, E.P., Poznanski, E. & Mason, S. (1979). A note on the female adolescent's psychological reactions to breast development. *J Am Acad Child Psychiatry*, Vol. 18, No. 3, pp. 537-45.
- Beneke, R., Geisen, C., Zevnik, B., Bauch, T., Muller, W.U., Kupper, J.H. & Moroy, T. (2000). DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosylation) but have different requirements for p53. *Mol Cell Biol*, Vol. 20, No. 18, pp. 6695-703.
- Benhaim, D.I., Lopchinsky, R. & Tartter, P.I. (2000). Lumpectomy with tamoxifen as primary treatment for elderly women with early-stage breast cancer. *Am J Surg*, Vol. 180, No. 3, pp. 162-6.
- Berg, R.W., Werner, M., Ferguson, P.J., Postenka, C., Vincent, M., Koropatnick, D.J. & Behrend, E. (2001). Tumor growth inhibition in vivo and G2/M cell cycle arrest induced by antisense oligodeoxynucleotide targeting thymidylate synthase. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 298, No. 2, pp. 477-84.
- Berg, W.A., Gutierrez, L., NessAiver, M.S., Carter, W.B., Bhargavan, M., Lewis, R.S. & Ioffe, O.B. (2004). Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*, Vol. 233, No. 3, pp. 830-49.
- Berkeley-Lab (2009). Cell lines. Disponible en: <http://icbp.lbl.gov/breastcancer/celllines.php>.
- Berns, A. (2006). Cancer biology: can less be more for p53? *Nature*, Vol. 443, No. 7108, pp. 153-4.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. & Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, Vol. 128, No. 4, pp. 669-81.
- Berry, D.A., Iversen, E.S., Jr., Gudbjartsson, D.F., Hiller, E.H., Garber, J.E., Peshkin, B.N., Lerman, C., Watson, P., Lynch, H.T., Hilsenbeck, S.G., Rubinstein, W.S., Hughes, K.S. & Parmigiani, G. (2002). BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*, Vol. 20, No. 11, pp. 2701-12.
- Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G. & Moses, H.L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, Vol. 303, No. 5659, pp. 848-51.
- Bibbo, M., Scheiber, M., Cajulis, R., Keebler, C.M., Wied, G.L. & Dowlathshahi, K. (1988). Stereotaxic fine needle aspiration cytology of clinically occult malignant and premalignant breast lesions. *Acta Cytol*, Vol. 32, No. 2, pp. 193-201.
- Bidard, F.C., Pierga, J.Y., Vincent Salomon, A. & Poupon, M.F. (2007). A "class action" against the microenvironment: Do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 27, pp. 5-10.
- Bindra, R.S. & Glazer, P.M. (2005). Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res*, Vol. 569, No. 1-2, pp. 75-85.
- Bishop, J.M.a.W., R.A. (eds.) (1996). *Scientific American Molecular Oncology*, New York, NY: Scientific American, Inc., p. 255.
- Bockhorn, M., Jain, R.K. & Munn, L.L. (2007). Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol*, Vol. 8, No. 5, pp. 444-8.

- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S. & Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, Vol. 120, No. 3, pp. 303-13.
- Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 5, No. 9, pp. 769-84.
- Bondy, M.L., Lustbader, E.D., Halabi, S., Ross, E. & Vogel, V.G. (1994). Validation of a breast cancer risk assessment model in women with a positive family history. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 86, No. 8, pp. 620-5.
- Bosco, E.E. & Knudsen, E.S. (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle*, Vol. 6, No. 6, pp. 667-71.
- Bouck, N., Stellmach, V. & Hsu, S.C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*, Vol. 69, pp. 135-74.
- Brahimi-Horn, M.C. & Pouyssegur, J. (2005). The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int Rev Cytol*, Vol. 242, pp. 157-213.
- Brenner, C. & Fuks, F. (2006). DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 301, pp. 45-66.
- Brewster, A.M., Christo, D.K., Lai, H. & Helzlsouer, K. (2005). Breast carcinoma chemoprevention in the community setting. Estimating risks and benefits. *Cancer*, Vol. 103, No. 6, pp. 1147-53.
- Brisken, C. (2002). Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 7, No. 1, pp. 39-48.
- Brodowicz, T., Kandioler, D., Tomek, S., Ludwig, C., Rudas, M., Kunstfeld, R., Koestler, W., Hejna, M., Budinsky, A., Wiltschke, C. & Zielinski, C.C. (2001). Anti-Her-2/neu antibody induces apoptosis in Her-2/neu overexpressing breast cancer cells independently from p53 status. *Br J Cancer*, Vol. 85, No. 11, pp. 1764-70.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H. & Lyko, F. (2007). The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 4, pp. 1419-23.
- Bryan, T.M. & Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 11, No. 3, pp. 318-24.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J. & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, Vol. 434, No. 7035, pp. 913-7.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Poremba, C., Diallo, R., Decker, T., Riethdorf, L., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B. & Boecker, W. (1999). Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol*, Vol. 187, No. 4, pp. 396-402.
- Burke, W., Daly, M., Garber, J., Botkin, J., Kahn, M.J., Lynch, P., McTiernan, A., Offit, K., Perlman, J., Petersen, G., Thomson, E. & Varricchio, C. (1997). Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA*, Vol. 277, No. 12, pp. 997-1003.
- Burstein, H.J., Polyak, K., Wong, J.S., Lester, S.C. & Kaelin, C.M. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*, Vol. 350, No. 14, pp. 1430-41.

- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B. & Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, Vol. 31, No. 3, pp. 164-72.
- Cameron, E.E., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1999). p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*, Vol. 94, No. 7, pp. 2445-51.
- Cariati, M. & Purushotham, A.D. (2008). Stem cells and breast cancer. *Histopathology*, Vol. 52, No. 1, pp. 99-107.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, Vol. 69 Suppl 3, pp. 4-10.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E. & Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, No. 10, pp. 4285-9.
- Carter, R.L. (1978). Metastatic potential of malignant tumours. *Invest Cell Pathol*, Vol. 1, No. 3, pp. 275-86.
- Casalini, P., Iorio, M.V., Galmozzi, E. & Menard, S. (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol*, Vol. 200, No. 3, pp. 343-50.
- Ceteci, F., Ceteci, S., Karreman, C., Kramer, B.W., Asan, E., Gotz, R. & Rapp, U.R. (2007). Disruption of tumor cell adhesion promotes angiogenic switch and progression to micrometastasis in RAF-driven murine lung cancer. *Cancer Cell*, Vol. 12, No. 2, pp. 145-59.
- Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P. & Rao, V.N. (1999). The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*, Vol. 18, No. 1, pp. 263-8.
- Chambers, A.F. & Matrisian, L.M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 89, No. 17, pp. 1260-70.
- Chang, S.F., Chang, C.A., Lee, D.Y., Lee, P.L., Yeh, Y.M., Yeh, C.R., Cheng, C.K., Chien, S. & Chiu, J.J. (2008). Tumor cell cycle arrest induced by shear stress: roles of integrins and Smad. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 105, No. 10, pp. 3927-32.
- Chang, Y., Zuka, M., Perez-Pinera, P., Astudillo, A., Mortimer, J., Berenson, J.R. & Deuel, T.F. (2007). Secretion of pleiotrophin stimulates breast cancer progression through remodeling of the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 104, No. 26, pp. 10888-93.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adelaide, J., Cervera, N., Fekairi, S., Xerri, L., Jacquemier, J., Birnbaum, D. & Bertucci, F. (2006). Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*, Vol. 25, No. 15, pp. 2273-84.
- Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M. & Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, Vol. 14, No. 5, pp. 1368-76.
- Chedin, F., Lieber, M.R. & Hsieh, C.L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, No. 26, pp. 16916-21.

- Chen, J., Pee, D., Ayyagari, R., Graubard, B., Schairer, C., Byrne, C., Benichou, J. & Gail, M.H. (2006). Projecting absolute invasive breast cancer risk in white women with a model that includes mammographic density. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, No. 17, pp. 1215-26.
- Chen, W.Y., Zeng, X., Carter, M.G., Morrell, C.N., Chiu Yen, R.W., Esteller, M., Watkins, D.N., Herman, J.G., Mankowski, J.L. & Baylin, S.B. (2003). Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet*, Vol. 33, No. 2, pp. 197-202.
- Cheng, J.C., Yoo, C.B., Weisenberger, D.J., Chuang, J., Wozniak, C., Liang, G., Marquez, V.E., Greer, S., Orntoft, T.F., Thykjaer, T. & Jones, P.A. (2004). Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*, Vol. 6, No. 2, pp. 151-8.
- Chepko, G. & Smith, G.H. (1997). Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell*, Vol. 29, No. 2, pp. 239-53.
- Chin, K., de Solorzano, C.O., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., Rodriguez, E.G., Kuo, W.L., Ljung, B.M., Chew, K., Myambo, K., Miranda, M., Krig, S., Garbe, J., Stampfer, M., Yaswen, P., Gray, J.W. & Lockett, S.J. (2004). En: situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet*, Vol. 36, No. 9, pp. 984-8.
- Christofori, G. & Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, Vol. 24, No. 2, pp. 73-6.
- Chu, E. & DeVita, V.T. (2002). *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manua*, London, UK: Jones and Bartlett Publishers, p. 504.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L. & Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 19, pp. 9339-44.
- Clarke, M.F. & Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, Vol. 124, No. 6, pp. 1111-5.
- Clarke, R.B. (2004). Human breast cell proliferation and its relationship to steroid receptor expression. *Climacteric*, Vol. 7, No. 2, pp. 129-37.
- Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S. & Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res*, Vol. 57, No. 22, pp. 4987-91.
- CLS (2009). Human breast cell lines. Disponible en: http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e1753/index_eng.html.
- Condeelis, J. & Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, Vol. 124, No. 2, pp. 263-6.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, Vol. 11, No. 5, pp. 1921-9.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. & Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, Vol. 295, No. 5564, pp. 2387-92.
- Daniel, C.W. & Smith, G.H. (1999). The mammary gland: a model for development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 4, No. 1, pp. 3-8.

- Decarli, A., Calza, S., Masala, G., Specchia, C., Palli, D. & Gail, M.H. (2006). Gail model for prediction of absolute risk of invasive breast cancer: independent evaluation in the Florence-European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, No. 23, pp. 1686-93.
- Dennison, G., Anand, R., Makar, S.H. & Pain, J.A. (2003). A prospective study of the use of fine-needle aspiration cytology and core biopsy in the diagnosis of breast cancer. *Breast J*, Vol. 9, No. 6, pp. 491-3.
- Deome, K.B., Faulkin, L.J., Jr., Bern, H.A. & Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res*, Vol. 19, No. 5, pp. 515-20.
- Deryugina, E.I. & Quigley, J.P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 25, No. 1, pp. 9-34.
- Diaz-Martinez, L.A. & Yu, H. (2007). Running on a treadmill: dynamic inhibition of APC/C by the spindle checkpoint. *Cell Div*, Vol. 2, pp. 23.
- Dietrich, D., Lesche, R., Tetzner, R., Krispin, M., Dietrich, J., Haedicke, W., Schuster, M. & Kristiansen, G. (2009). Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem*, Vol. 57, No. 5, pp. 477-89.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J. & Wicha, M.S. (2003a). En: vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, Vol. 17, No. 10, pp. 1253-70.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F. & Wicha, M.S. (2003b). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, Vol. 36 Suppl 1, pp. 59-72.
- Dontu, G., El-Ashry, D. & Wicha, M.S. (2004a). Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*, Vol. 15, No. 5, pp. 193-7.
- Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E., Kawamura, M.J., Abdallah, W.M. & Wicha, M.S. (2004b). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, Vol. 6, No. 6, pp. R605-15.
- Dontu, G. & Wicha, M.S. (2005). Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 10, No. 1, pp. 75-86.
- Dooley, W.C., Francescatti, D., Clark, L. & Webber, G. (2004). Office-based breast ductoscopy for diagnosis. *Am J Surg*, Vol. 188, No. 4, pp. 415-8.
- Doree, M. & Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci*, Vol. 115, No. Pt 12, pp. 2461-4.
- Dumitrescu, R.G. & Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, Vol. 9, No. 1, pp. 208-21.
- Dupont, W.D. & Page, D.L. (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*, Vol. 312, No. 3, pp. 146-51.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, Vol. 315, No. 26, pp. 1650-9.
- Dvorak, H.F. (2005). Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*, Vol. 3, No. 8, pp. 1835-42.
- Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P.V. & Laird, P.W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, Vol. 28, No. 8, pp. E32.

- Edsander-Nord, A., Brandberg, Y. & Wickman, M. (2001). Quality of life, patients' satisfaction, and aesthetic outcome after pedicled or free TRAM flap breast surgery. *Plast Reconstr Surg*, Vol. 107, No. 5, pp. 1142-53; discussion 1154-5.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, Vol. 429, No. 6990, pp. 457-63.
- Elenbaas, B. & Weinberg, R.A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*, Vol. 264, No. 1, pp. 169-84.
- Elston, C.W. & Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, Vol. 19, No. 5, pp. 403-10.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, Vol. 8, No. 4, pp. 286-98.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, Vol. 358, No. 11, pp. 1148-59.
- Esteller, M. & Almouzni, G. (2005). How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. *EMBO Rep*, Vol. 6, No. 7, pp. 624-8.
- Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., García-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M.J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M.A., Borg, A., Aaltonen, L.A., Ponder, B.A., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, Vol. 10, No. 26, pp. 3001-7.
- Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., Gabrielson, E., Schutte, M., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 92, No. 7, pp. 564-9.
- Esteva, F.J. & Hortobagyi, G.N. (2004). Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res*, Vol. 6, No. 3, pp. 109-18.
- Evan, G.I. & Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, Vol. 411, No. 6835, pp. 342-8.
- Evron, E., Dooley, W.C., Umbricht, C.B., Rosenthal, D., Sacchi, N., Gabrielson, E., Soito, A.B., Hung, D.T., Ljung, B., Davidson, N.E. & Sukumar, S. (2001). Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet*, Vol. 357, No. 9265, pp. 1335-6.
- Fabbri, A., Carcangiu, M.L. & Carbone, A. (2008). Histological classification of breast cancer. *Breast Cancer*, pp. 3-14.
- Fackler, M.J., Malone, K., Zhang, Z., Schilling, E., Garrett-Mayer, E., Swift-Scanlan, T., Lange, J., Nayar, R., Davidson, N.E., Khan, S.A. & Sukumar, S. (2006). Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid. *Clin Cancer Res*, Vol. 12, No. 11 Pt 1, pp. 3306-10.
- Fackler, M.J., McVeigh, M., Mehrotra, J., Blum, M.A., Lange, J., Lapides, A., Garrett, E., Argani, P. & Sukumar, S. (2004). Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 64, No. 13, pp. 4442-52.
- Fackler, M.J., Rivers, A., Teo, W.W., Mangat, A., Taylor, E., Zhang, Z., Goodman, S., Argani, P., Nayar, R., Susnik, B., Sukumar, S. & Khan, S.A. (2009). Hypermethylated

- genes as biomarkers of cancer in women with pathologic nipple discharge. *Clin Cancer Res*, Vol. 15, No. 11, pp. 3802-11.
- Fadeel, B. & Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*, Vol. 258, No. 6, pp. 479-517.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M., Jackson, S.P., Smith, G.C. & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, Vol. 434, No. 7035, pp. 917-21.
- Fedi, P., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. (1997). Growth factors. En: *Cancer Medicine*. Holland, J.F., Frei E. III, Bast R.C. JR., Kufe D.W., Morton D.L. & Weichselbaum R.R (Eds.). Baltimore, MD: Williams & Wilkins. pp. 41-64.
- Feinberg, A.P., Cui, H. & Ohlsson, R. (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol*, Vol. 12, No. 5, pp. 389-98.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. & Parkin, D.M. (2001). Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. *IARC Cancer Vol. Base No. 5*, pp. 153-6.
- Fidler, I.J. & Hart, I.R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, Vol. 217, No. 4564, pp. 998-1003.
- Fidler, I.J. & Kripke, M.L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, Vol. 197, No. 4306, pp. 893-5.
- Fillmore, C.M. & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, Vol. 10, No. 2, pp. R25.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.H. & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 16, pp. 1233-41.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L. & Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 90, No. 18, pp. 1371-88.
- Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E.R., Bauer, M., Wolmark, N., Wickerham, D.L., Deutsch, M., Montague, E., Margolese, R. & Foster, R. (1985). Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med*, Vol. 312, No. 11, pp. 674-81.
- Fisher, E.R., Anderson, S., Redmond, C. & Fisher, B. (1993). Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*, Vol. 71, No. 8, pp. 2507-14.
- Folkman, J. (1997). Tumor angiogenesis. En: *Cancer Medicine*. Holland, J.F., Frei E. III, Bast R.C. JR., Kufe D.W., Morton D.L. & Weichselbaum R.R (Eds.). Baltimore, MD: Williams & Wilkins. pp. 181-204.
- Ford, H.L. & Pardee, A.B. (1999). Cancer and the cell cycle. *J Cell Biochem*, Vol. Suppl 32-33, pp. 166-72.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A.,

- Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C. & Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, No. 30, pp. 10604-9.
- Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells, a manual of basic technique. *Wiley-Liss. New York, NY*, Vol. 4ta ed.
- Fridlyand, J., Snijders, A.M., Ylstra, B., Li, H., Olshen, A., Segraves, R., Dairkee, S., Tokuyasu, T., Ljung, B.M., Jain, A.N., McLennan, J., Ziegler, J., Chin, K., Devries, S., Feiler, H., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. & Albertson, D.G. (2006). Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer*, Vol. 6, pp. 96.
- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R. & Fuchs, R.P. (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*, Vol. 18, No. 5, pp. 499-505.
- Friedenreich, C.M. (2001). Review of anthropometric factors and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev*, Vol. 10, No. 1, pp. 15-32.
- Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. & et al. (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, Vol. 266, No. 5182, pp. 120-2.
- Gagos, S., Iliopoulos, D., Tseleni-Balafouta, S., Agapitos, M., Antachopoulos, C., Kostakis, A., Karayannakos, P. & Skalkeas, G. (1996). Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity: studies on two immortal colon cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, Vol. 90, No. 2, pp. 157-65.
- Gail, M.H., Brinton, L.A., Byar, D.P., Corle, D.K., Green, S.B., Schairer, C. & Mulvihill, J.J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 81, No. 24, pp. 1879-86.
- Galm, O., Rountree, M.R., Bachman, K.E., Jair, K.W., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2002). Enzymatic regional methylation assay: a novel method to quantify regional CpG methylation density. *Genome Res*, Vol. 12, No. 1, pp. 153-7.
- Gao, C., Furge, K., Koeman, J., Dykema, K., Su, Y., Cutler, M.L., Werts, A., Haak, P. & Vande Woude, G.F. (2007). Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 104, No. 21, pp. 8995-9000.
- García-Foncillas, J. (2003). *Biología Molecular en Cáncer: Programa Interactivo de Formación*. Editorial AstraZeneca. Barcelona, pp. 489.
- García-Foncillas, J., E Bandrés, V Catalán, F García-Amigot & Zabalegui, N. (2001). Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. *Anales Sis San Navarra*, Vol. 24, pp. 31-52.
- Gasparini, G. (1999). The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*, Vol. 58, No. 1, pp. 17-38.
- Genis, L., Galvez, B.G., Gonzalo, P. & Arroyo, A.G. (2006). MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 25, No. 1, pp. 77-86.
- Giuliano, A.E. (2006). Mama. En: *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*. Lawrence M. Tierney, J., Stephen T. Mcphee, Maxine A. Papadakis (Ed.) 44. San Francisco: Manual Moderno. pp. 605-628.

- Glazer, R.I., Wang, X., Yuan, H. & Yin, Y. (2007). Mammary stem and progenitor cell regulation. *Cancer Biomark*, Vol. 3, No. 4-5, pp. 171-81.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N. & Esteva, F.J. (2006). Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist*, Vol. 11, No. 8, pp. 857-67.
- Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M. & Jones, P.A. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*, Vol. 55, No. 20, pp. 4531-5.
- Gradishar, W.J. (2005). The future of breast cancer: the role of prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 89 Suppl 1, pp. S17-26.
- Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, Vol. 94, No. 6, pp. 695-8.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, Vol. 281, pp. 1309-1312.
- Greene, F.L.e. (2002). AJCC cancer staging manual. *Springer-Verlag. New York, NY*, Vol. 6ta ed., pp. 450.
- Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E. & Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*, Vol. 83, No. 2, pp. 155-8.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D. & Muller, W.J. (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, No. 22, pp. 10578-82.
- Haber, D.A. & Fearon, E.R. (1998). The promise of cancer genetics. *Lancet*, Vol. 351 Suppl 2, pp. SIII-8.
- Haffty, B.G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S.A., Weidhaas, J., Harris, L., Hait, W. & Toppmeyer, D. (2006). Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, Vol. 24, No. 36, pp. 5652-7.
- Hamburger, A.W. & Salmon, S.E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, Vol. 197, No. 4302, pp. 461-3.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, Vol. 86, No. 3, pp. 353-64.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. 100, No. 1, pp. 57-70.
- Haq, R. & Zanke, B. (1998). Inhibition of apoptotic signaling pathways in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance. *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 17, No. 2, pp. 233-9.
- Harjit, K., Willsher, P.C., Bennett, M., Jackson, L.R., Metcalf, C. & Saunders, C.M. (2006). Multiple papillomas of the breast: is current management adequate? *Breast*, Vol. 15, No. 6, pp. 777-81.
- Harris, E.E., Hwang, W.T., Urtishak, S.L., Plastaras, J., Kinosian, B. & Solin, L.J. (2008). The impact of comorbidities on outcomes for elderly women treated with breast-conservation treatment for early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 70, No. 5, pp. 1453-9.
- Harris, E.E. & Solin, L.J. (2000). Treatment of early-stage breast cancer in elderly women. *Med Pediatr Oncol*, Vol. 34, No. 1, pp. 48-52.

- Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P. & Tachibana, T. (1969). Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, Vol. 223, No. 5204, pp. 363-8.
- Harris, J.R., Lippman, M.E., Veronesi, U. & Willett, W. (1992). Breast cancer (1). *N Engl J Med*, Vol. 327, No. 5, pp. 319-28.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, Vol. 62, No. 11, pp. 1180-90.
- Hellebrekers, D.M., Griffioen, A.W. & van Engeland, M. (2007a). Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1775, No. 1, pp. 76-91.
- Hellebrekers, D.M., Jair, K.W., Vire, E., Eguchi, S., Hoebbers, N.T., Fraga, M.F., Esteller, M., Fuks, F., Baylin, S.B., van Engeland, M. & Griffioen, A.W. (2006). Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors. *Mol Cancer Ther*, Vol. 5, No. 2, pp. 467-75.
- Hellebrekers, D.M., Melotte, V., Vire, E., Langenkamp, E., Molema, G., Fuks, F., Herman, J.G., Van Criekinge, W., Griffioen, A.W. & van Engeland, M. (2007b). Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 9, pp. 4138-48.
- Hennighausen, L. & Robinson, G.W. (1998). Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev*, Vol. 12, No. 4, pp. 449-55.
- Heppner, G.H. (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer Res*, Vol. 44, No. 6, pp. 2259-65.
- Herd-Smith, A., Russo, A., Muraca, M.G., Del Turco, M.R. & Cardona, G. (2001). Prognostic factors for lymphedema after primary treatment of breast carcinoma. *Cancer*, Vol. 92, No. 7, pp. 1783-7.
- Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, Vol. 349, No. 21, pp. 2042-54.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 93, No. 18, pp. 9821-6.
- Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D.S., Gnarr, J.R., Linehan, W.M. & et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 91, No. 21, pp. 9700-4.
- Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., Sidransky, D. & Baylin, S.B. (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, Vol. 55, No. 20, pp. 4525-30.
- Hetts, S.W. (2000). To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, Vol. 279, pp. 300-307.
- Heyder, C., Gloria-Maercker, E., Hatzmann, W., Zaenker, K.S. & Dittmar, T. (2006). Visualization of tumor cell extravasation. *Contrib Microbiol*, Vol. 13, pp. 200-8.
- Ho, H.Y., Chang, K.H., Nichols, J. & Li, M. (2009). Homeodomain protein Pitx3 maintains the mitotic activity of lens epithelial cells. *Mech Dev*, Vol. 126, No. 1-2, pp. 18-29.
- Hojilla, C.V., Mohammed, F.F. & Khokha, R. (2003). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*, Vol. 89, No. 10, pp. 1817-21.

- Horan, T., Wen, J., Arakawa, T., Liu, N., Brankow, D., Hu, S., Ratzkin, B. & Philo, J.S. (1995). Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J Biol Chem*, Vol. 270, No. 41, pp. 24604-8.
- Hoshino, K. & Gardner, W.U. (1967). Transplantability and life span of mammary gland during serial transplantation in mice. *Nature*, Vol. 213, No. 5072, pp. 193-4.
- Houle, F. & Huot, J. (2006). Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Mol Carcinog*, Vol. 45, No. 6, pp. 362-7.
- Howard, B. & Ashworth, A. (2006). Signalling pathways implicated in early mammary gland morphogenesis and breast cancer. *PLoS Genet*, Vol. 2, No. 8, pp. e112.
- Hsu, J.Y., Reimann, J.D., Sorensen, C.S., Lukas, J. & Jackson, P.K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol*, Vol. 4, No. 5, pp. 358-66.
- Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K.E., van den Brule, F., Velculescu, V. & Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, Vol. 37, No. 8, pp. 899-905.
- Hua, S., Kittler, R. & White, K.P. (2009). Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell*, Vol. 137, No. 7, pp. 1259-71.
- Huang, Z., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Hunter, D.J., Manson, J.E., Hennekens, C.H., Rosner, B., Speizer, F.E. & Willett, W.C. (1997). Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA*, Vol. 278, No. 17, pp. 1407-11.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M. & Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, Vol. 9, No. 3, pp. 1165-72.
- Humpherys, D., Eggen, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W.M., 3rd, Biniszkiwicz, D., Yanagimachi, R. & Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, Vol. 293, No. 5527, pp. 95-7.
- Hussain, S.P., Hollstein, M.H. & Harris, C.C. (2000). p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 919, pp. 79-85.
- Hyman, E., Kauraniemi, P., Hautaniemi, S., Wolf, M., Mousset, S., Rozenblum, E., Ringner, M., Sauter, G., Monni, O., Elkahloun, A., Kallioniemi, O.P. & Kallioniemi, A. (2002). Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 62, No. 21, pp. 6240-5.
- Imaginis (2009). Advanced (metastatic) breast cancer. Disponible en: <http://imaginis.com/breasthealth/metastatic.asp>.
- Iorns, E., Turner, N.C., Elliott, R., Syed, N., Garrone, O., Gasco, M., Tutt, A.N., Crook, T., Lord, C.J. & Ashworth, A. (2008). Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Cell*, Vol. 13, No. 2, pp. 91-104.
- Israels, E.D. & Israels, L.G. (2001). The cell cycle. *Stem Cells*, Vol. 19, No. 1, pp. 88-91.
- Jackson, A.L. & Loeb, L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*, Vol. 477, No. 1-2, pp. 7-21.
- Janes, P.W., Daly, R.J., deFazio, A. & Sutherland, R.L. (1994). Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2. *Oncogene*, Vol. 9, No. 12, pp. 3601-8.

- Janes, S.M., Lowell, S. & Hutter, C. (2002). Epidermal stem cells. *J Pathol*, Vol. 197, No. 4, pp. 479-91.
- Jeffrey, S.S., Lonning, P.E. & Hillner, B.E. (2005). Genomics-based prognosis and therapeutic prediction in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, Vol. 3, No. 3, pp. 291-300.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, Vol. 293, No. 5532, pp. 1074-80.
- Johnson, D.G. & Walker, C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Vol. 39, pp. 295-312.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, Vol. 3, No. 6, pp. 415-28.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, Vol. 128, No. 4, pp. 683-92.
- Jones, P.A. & Taylor, S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, Vol. 20, No. 1, pp. 85-93.
- Kakar, S., Puangsuvan, N., Stevens, J.M., Serenas, R., Mangan, G., Sahai, S. & Mihalov, M.L. (2000). HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn*, Vol. 5, No. 3, pp. 199-207.
- Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W. & Pinkel, D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, Vol. 10, No. 4, pp. 231-43.
- Kalluri, R. & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, No. 5, pp. 392-401.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A. & Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, Vol. 3, No. 6, pp. 537-49.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. & Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, Vol. 449, No. 7162, pp. 557-63.
- Karpf, A.R. & Matsui, S. (2005). Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res*, Vol. 65, No. 19, pp. 8635-9.
- Kennedy, R.D. & D'Andrea, A.D. (2006). DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol*, Vol. 24, No. 23, pp. 3799-808.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, Vol. 26, No. 4, pp. 239-57.
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.E., Lee, S.W., Moon, E.J., Kim, H.S., Lee, S.K., Chung, H.Y., Kim, C.W. & Kim, K.W. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*, Vol. 7, No. 4, pp. 437-43.
- Kim, R. (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 333, No. 2, pp. 336-43.

- King, M.C., Wieand, S., Hale, K., Lee, M., Walsh, T., Owens, K., Tait, J., Ford, L., Dunn, B.K., Costantino, J., Wickerham, L., Wolmark, N. & Fisher, B. (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: national surgical adjuvant breast and bowel project (NSABP-P1) breast cancer prevention trial. *JAMA*, Vol. 286, No. 18, pp. 2251-6.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, Vol. 386, No. 6627, pp. 761, 763.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science*, Vol. 280, No. 5366, pp. 1036-7.
- Knudson, A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 90, No. 23, pp. 10914-21.
- Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P. & Andersson, K.K. (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1699, No. 1-2, pp. 1-34.
- Kordon, E.C. & Smith, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development*, Vol. 125, No. 10, pp. 1921-30.
- Kornberg, R.D. & Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, Vol. 98, No. 3, pp. 285-94.
- Krtolica, A. & Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 34, No. 11, pp. 1401-14.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A. & Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101, No. 14, pp. 4966-71.
- Kuperwasser, C., Dessain, S., Bierbaum, B.E., Garnet, D., Sperandio, K., Gauvin, G.P., Naber, S.P., Weinberg, R.A. & Rosenblatt, M. (2005). A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res*, Vol. 65, No. 14, pp. 6130-8.
- Lacroix, M. & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 83, No. 3, pp. 249-89.
- Lakhani, S.R. (1999). The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*, Vol. 187, No. 3, pp. 272-8.
- LaMarca, H.L. & Rosen, J.M. (2008). Minireview: hormones and mammary cell fate-what will I become when I grow up? *Endocrinology*, Vol. 149, No. 9, pp. 4317-21.
- Landberg, G., Nielsen, N.H., Nilsson, P., Emdin, S.O., Cajander, J. & Roos, G. (1997). Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 57, No. 3, pp. 549-54.
- Langley, R.R. & Fidler, I.J. (2007). Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*, Vol. 28, No. 3, pp. 297-321.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A. & Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, Vol. 367, No. 6464, pp. 645-8.
- Lazar, V., Grandjouan, S., Bognel, C., Couturier, D., Rougier, P., Bellet, D. & Bressac-de Paillerets, B. (1994). Accumulation of multiple mutations in tumour suppressor genes during colorectal tumorigenesis in HNPCC patients. *Hum Mol Genet*, Vol. 3, No. 12, pp. 2257-60.

- Lemieux, J., Maunsell, E. & Provencher, L. (2008). Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *Psychooncology*, Vol. 17, No. 4, pp. 317-28.
- Lerwill, M.F. (2004). Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am J Surg Pathol*, Vol. 28, No. 8, pp. 1076-91.
- Levin, E.R. (2003). Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol*, Vol. 17, No. 3, pp. 309-17.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, Vol. 88, No. 3, pp. 323-31.
- Levine, M., Moutquin, J.M., Walton, R. & Feightner, J. (2001). Chemoprevention of breast cancer. A joint guideline from the canadian task force on preventive health care and the Canadian breast cancer initiative's steering committee on clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer. *CMAJ*, Vol. 164, No. 12, pp. 1681-90.
- Lewis, C.M., Cler, L.R., Bu, D.W., Zochbauer-Muller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E.Z., Leitch, A.M., Minna, J.D. & Euhus, D.M. (2005). Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clin Cancer Res*, Vol. 11, No. 1, pp. 166-72.
- Lewis, G.D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W.L., Carter, P., Gorman, C. & Shepard, H.M. (1993). Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother*, Vol. 37, No. 4, pp. 255-63.
- Li, F., Tiede, B., Massague, J. & Kang, Y. (2007a). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*, Vol. 17, No. 1, pp. 3-14.
- Li, H., Fan, X. & Houghton, J. (2007b). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*, Vol. 101, No. 4, pp. 805-15.
- Liao, D. & Johnson, R.S. (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 26, No. 2, pp. 281-90.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, Vol. 362, No. 6422, pp. 709-15.
- Liu, D. & Hornsby, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 7, pp. 3117-26.
- Liu, G.Y., Lu, J.S., Shen, K.W., Wu, J., Chen, C.M., Hu, Z., Shen, Z.Z., Zhang, T.Q. & Shao, Z.M. (2008). Fiberoptic ductoscopy combined with cytology testing in the patients of spontaneous nipple discharge. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 108, No. 2, pp. 271-7.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson, K.W., Suri, P. & Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 12, pp. 6063-71.
- Liu, S., Dontu, G. & Wicha, M.S. (2005). Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res*, Vol. 7, No. 3, pp. 86-95.
- Liu, Y.L., Matsuzaki, T., Nakazawa, T., Murata, S., Nakamura, N., Kondo, T., Iwashina, M., Mochizuki, K., Yamane, T., Takata, K. & Katoh, R. (2007). Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Hum Pathol*, Vol. 38, No. 1, pp. 171-8.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, Vol. 25, No. 4, pp. 402-8.

- Lo, P.K. & Sukumar, S. (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, Vol. 9, No. 12, pp. 1879-902.
- Lobanova, Y.S., Scherbakov, A.M., Shatskaya, V.A. & Krasil'nikov, M.A. (2007). Mechanism of estrogen-induced apoptosis in breast cancer cells: role of the NF-kappaB signaling pathway. *Biochemistry (Mosc)*, Vol. 72, No. 3, pp. 320-7.
- Lonardo, F., Di Marco, E., King, C.R., Pierce, J.H., Segatto, O., Aaronson, S.A. & Di Fiore, P.P. (1990). The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol*, Vol. 2, No. 11, pp. 992-1003.
- Longacre, T.A. & Bartow, S.A. (1986). A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *Am J Surg Pathol*, Vol. 10, No. 6, pp. 382-93.
- Loo, L.W., Grove, D.I., Williams, E.M., Neal, C.L., Cousens, L.A., Schubert, E.L., Holcomb, I.N., Massa, H.F., Glogovac, J., Li, C.I., Malone, K.E., Daling, J.R., Delrow, J.J., Trask, B.J., Hsu, L. & Porter, P.L. (2004). Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res*, Vol. 64, No. 23, pp. 8541-9.
- Love, R.R., Duc, N.B., Havighurst, T.C., Mohsin, S.K., Zhang, Q., DeMets, D.L. & Allred, D.C. (2003). Her-2/neu overexpression and response to oophorectomy plus tamoxifen adjuvant therapy in estrogen receptor-positive premenopausal women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*, Vol. 21, No. 3, pp. 453-7.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P.P., Caldas, C., Miska, E. & Esteller, M. (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 4, pp. 1424-9.
- Lukashev, M.E. & Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, Vol. 8, No. 11, pp. 437-41.
- Lundberg, A.S. & Weinberg, R.A. (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*, Vol. 35, No. 4, pp. 531-9.
- Lyman, G.H., Giuliano, A.E. & Somerfield, M.R. (2005). American society of clinical oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer *J Clin Oncol* Vol. 23, pp. 7703-20.
- Ma, X.J., Salunga, R., Tuggle, J.T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B.M., Zhou, Y.X., Varnholt, H., Smith, B., Gadd, M., Chatfield, E., Kessler, J., Baer, T.M., Erlander, M.G. & Sgroi, D.C. (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, No. 10, pp. 5974-9.
- Macaluso, M., Paggi, M.G. & Giordano, A. (2003). Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene*, Vol. 22, No. 42, pp. 6472-8.
- Machida, Y.J. & Dutta, A. (2007). The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev*, Vol. 21, No. 2, pp. 184-94.
- Machida, Y.J., Hamlin, J.L. & Dutta, A. (2005). Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell*, Vol. 123, No. 1, pp. 13-24.
- Mack, G.S. (2006). Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, No. 20, pp. 1443-4.
- Mareel, M. & Madani, I. (2006). Tumour-associated host cells participating at invasion and metastasis: targets for therapy? *Acta Chir Belg*, Vol. 106, No. 6, pp. 635-40.

- Markopoulos, C., Berger, U., Wilson, P., Gazet, J.C. & Coombes, R.C. (1988). Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed)*, Vol. 296, No. 6633, pp. 1349-51.
- Marshman, E., Booth, C. & Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, Vol. 24, No. 1, pp. 91-8.
- Martínez-Montañez, O.G. & Mainero-Ratchelous, F. (2004). Detección and atención integral del cáncer de mama. Guía técnica. *Instituto Mexicano del Seguro Social*.
- Masters, J.R. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 1, No. 3, pp. 233-6.
- McArthur, H.L. & Hudis, C.A. (2007). The medical treatment of metastatic breast cancer. En: *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*. New York, NY.
- Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B. & Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, Vol. 1, No. 7, pp. 686-92.
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J. & Maley, C.C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, No. 12, pp. 924-35.
- Michael, W.M. & Newport, J. (1998). Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science*, Vol. 282, No. 5395, pp. 1886-9.
- Micke, P. & Ostman, A. (2004). Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, Vol. 45 Suppl 2, pp. S163-75.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L. & Massague, J. (2005a). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, Vol. 436, No. 7050, pp. 518-24.
- Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W.L., Blasberg, R. & Massague, J. (2005b). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*, Vol. 115, No. 1, pp. 44-55.
- Mirza, A.N., Mirza, N.Q., Vlastos, G. & Singletary, S.E. (2002). Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*, Vol. 235, No. 1, pp. 10-26.
- Mishell, D.R., Jr., Nakamura, R.M., Crosignani, P.G., Stone, S., Kharma, K., Nagata, Y. & Thorneycroft, I.H. (1971). Serum gonadotropin and steroid patterns during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 111, No. 1, pp. 60-5.
- Miyagi, K., Yamazaki, T., Tsujino, I., Takahashi, N., Koya, Y., Masutani, M., Sawada, U. & Horie, T. (2001). Application of hypothermia to autologous stem cell purging. *Cryobiology*, Vol. 42, No. 3, pp. 190-5.
- Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y. & Sasaki, H. (2001). Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*, Vol. 97, No. 5, pp. 1172-9.
- Moncrief, R.M., Nayar, R., Diaz, L.K., Staradub, V.L., Morrow, M. & Khan, S.A. (2005). A comparison of ductoscopy-guided and conventional surgical excision in women with spontaneous nipple discharge. *Ann Surg*, Vol. 241, No. 4, pp. 575-81.

- Moulis, S. & Sgroi, D.C. (2008). Re-evaluating early breast neoplasia. *Breast Cancer Res*, Vol. 10, No. 1, pp. 302.
- Moyano, J.V., Evans, J.R., Chen, F., Lu, M., Werner, M.E., Yehiely, F., Diaz, L.K., Turbin, D., Karaca, G., Wiley, E., Nielsen, T.O., Perou, C.M. & Cryns, V.L. (2006). AlphaB-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *J Clin Invest*, Vol. 116, No. 1, pp. 261-70.
- Muller, C.I., Ruter, B., Koeffler, H.P. & Lubbert, M. (2006). DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol*, Vol. 7, No. 5, pp. 315-21.
- Muller, H.M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., Marth, C. & Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res*, Vol. 63, No. 22, pp. 7641-5.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R. & Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, Vol. 54, No. 1, pp. 105-15.
- Muñoz, A. (1995). *Cáncer: Genes and Nuevas Terapias*, Madrid: Hélice, p. 250.
- Murata, S., Kominsky, S.L., Vali, M., Zhang, Z., Garrett-Mayer, E., Korz, D., Huso, D., Baker, S.D., Barber, J., Jaffee, E., Reilly, R.T. & Sukumar, S. (2006). Ductal access for prevention and therapy of mammary tumors. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 2, pp. 638-45.
- Murillo-Ortiz, B., Astudillo-De la Vega, H., Castillo-Medina, S., Malacara, J.M. & Benitez-Bribiesca, L. (2006). Telomerase activity, estrogen receptors (alpha, beta), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. *BMC Cancer*, Vol. 6, pp. 206.
- Narod, S.A., Dube, M.P., Klijn, J., Lubinski, J., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Provencher, D., Heimdal, K., Moller, P., Robson, M., Offit, K., Isaacs, C., Weber, B., Friedman, E., Gershoni-Baruch, R., Rennert, G., Pasini, B., Wagner, T., Daly, M., Garber, J.E., Neuhausen, S.L., Ainsworth, P., Olsson, H., Evans, G., Osborne, M., Couch, F., Foulkes, W.D., Warner, E., Kim-Sing, C., Olopade, O., Tung, N., Saal, H.M., Weitzel, J., Merajver, S., Gauthier-Villars, M., Jernstrom, H., Sun, P. & Brunet, J.S. (2002). Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 94, No. 23, pp. 1773-9.
- Naryzhny, S.N., Zhao, H. & Lee, H. (2005). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J Biol Chem*, Vol. 280, No. 14, pp. 13888-94.
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Venturo, I., Slamon, D.J., Fendly, B.M. & Ullrich, A. (1990). Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer*, Vol. 45, No. 3, pp. 457-61.
- Navarrete, M.A., Maier, C.M., Falzoni, R., Quadros, L.G., Lima, G.R., Baracat, E.C. & Nazario, A.C. (2005). Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res*, Vol. 7, No. 3, pp. R306-13.
- NCCN (2008). NCCN clinical practice guidelines in oncology. Invasive breast cancer. *National Comprehensive Cancer Network, Inc.*, Vol. 2, pp. 112.
- Neufeld, T.P. & Edgar, B.A. (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 10, No. 6, pp. 784-90.

- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. & Gray, J.W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, Vol. 10, No. 6, pp. 515-27.
- Neve, R.M., Schaefer, C., Buetow, K. & Gray, J.W. (2004). Genomic events in breast cancer progression. En: *Diseases of the Breast*. Harris, J., Lippman, M.E., Morrow, M. & Osborne, C.K. (Eds.) 3ra edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 383-395.
- Neville, M.C., McFadden, T.B. & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 7, No. 1, pp. 49-66.
- Nguyen, D.X. & Massague, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, Vol. 8, No. 5, pp. 341-52.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L.A., Ragaz, J., Gown, A.M., Gilks, C.B., van de Rijn, M. & Perou, C.M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, Vol. 10, No. 16, pp. 5367-74.
- NIH (1995). NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH consensus development panel on ovarian cancer. *JAMA*, Vol. 273, No. 6, pp. 491-7.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, Vol. 194, No. 4260, pp. 23-8.
- Nurse, P. (1997). Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer*, Vol. 33, No. 7, pp. 1002-4.
- Oakes, S.R., Hilton, H.N. & Ormandy, C.J. (2006). The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Res*, Vol. 8, No. 2, pp. 207.
- Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K.E., Cope, L., Mohammad, H.P., Chen, W., Daniel, V.C., Yu, W., Berman, D.M., Jenuwein, T., Pruitt, K., Sharkis, S.J., Watkins, D.N., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, Vol. 39, No. 2, pp. 237-42.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, Vol. 99, No. 3, pp. 247-57.
- Okazaki, A., Okazaki, M., Asaishi, K., Satoh, H., Watanabe, Y., Mikami, T., Toda, K., Okazaki, Y., Nabeta, K., Hirata, K. & et al. (1991). Fiberoptic ductoscopy of the breast: a new diagnostic procedure for nipple discharge. *Jpn J Clin Oncol*, Vol. 21, No. 3, pp. 188-93.
- Oki, Y., Aoki, E. & Issa, J.P. (2007). Decitabine-bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol*, Vol. 61, No. 2, pp. 140-52.

- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. & Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, Vol. 19, No. 13, pp. 3159-67.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L. & Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, Vol. 121, No. 3, pp. 335-48.
- Orimo, A. & Weinberg, R.A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, Vol. 5, No. 15, pp. 1597-601.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, Vol. 273, No. 5272, pp. 242-5.
- Osborne, C., Wilson, P. & Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*, Vol. 9, No. 4, pp. 361-77.
- Osborne, C.K., Bardou, V., Hopp, T.A., Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Wong, J., Allred, D.C., Clark, G.M. & Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 95, No. 5, pp. 353-61.
- Osborne, M.P. (2000). Breast anatomy and development. En: *Diseases of the breasts*. Harris, J., Lippman, M.E., Morrow, M. & Osborne, C.K. (Eds.) 2da edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1-13.
- Oshima, R.G., Lesperance, J., Munoz, V., Hebbard, L., Ranscht, B., Sharan, N., Muller, W.J., Hauser, C.A. & Cardiff, R.D. (2004). Angiogenic acceleration of Neu induced mammary tumor progression and metastasis. *Cancer Res*, Vol. 64, No. 1, pp. 169-79.
- Ouchi, T., Monteiro, A.N., August, A., Aaronson, S.A. & Hanafusa, H. (1998). BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 95, No. 5, pp. 2302-6.
- Partridge, A.H., Burstein, H.J. & Winer, E.P. (2001). Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, Vol. 30, pp. 135-8.
- Pecina-Slaus, N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, Vol. 3, No. 1, pp. 17.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, Vol. 406, No. 6797, pp. 747-52.
- Perry, J.A. & Kornbluth, S. (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div*, Vol. 2, pp. 12.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 7, No. 9, pp. 644-56.
- Petersen, O.W., Hoyer, P.E. & van Deurs, B. (1987). Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res*, Vol. 47, No. 21, pp. 5748-51.
- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H.,

- Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Ruschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S. & Gelber, R.D. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, Vol. 353, No. 16, pp. 1659-72.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M. & Yarden, Y. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J*, Vol. 15, No. 10, pp. 2452-67.
- Pollack, J.R., Sorlie, T., Perou, C.M., Rees, C.A., Jeffrey, S.S., Lonning, P.E., Tibshirani, R., Botstein, D., Borresen-Dale, A.L. & Brown, P.O. (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, No. 20, pp. 12963-8.
- Polyak, K. (2006). Pregnancy and breast cancer: the other side of the coin. *Cancer Cell*, Vol. 9, No. 3, pp. 151-3.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, Vol. 117, No. 11, pp. 3155-63.
- Polyak, K. & Hu, M. (2005). Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 10, No. 3, pp. 231-47.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A. & Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, Vol. 65, No. 13, pp. 5506-11.
- Porter, D., Lahti-Domenici, J., Keshaviah, A., Bae, Y.K., Argani, P., Marks, J., Richardson, A., Cooper, A., Strausberg, R., Riggins, G.J., Schnitt, S., Gabrielson, E., Gelman, R. & Polyak, K. (2003). Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*, Vol. 1, No. 5, pp. 362-75.
- Porter, D.A., Krop, I.E., Nasser, S., Sgroi, D., Kaelin, C.M., Marks, J.R., Riggins, G. & Polyak, K. (2001). A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res*, Vol. 61, No. 15, pp. 5697-702.
- Potten, C.S. & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, Vol. 110, No. 4, pp. 1001-20.
- Potten, C.S., Watson, R.J., Williams, G.T., Tickle, S., Roberts, S.A., Harris, M. & Howell, A. (1988). The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer*, Vol. 58, No. 2, pp. 163-70.
- Press, M.F., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D.J. (1990). Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, Vol. 5, No. 7, pp. 953-62.
- Press, M.F., Pike, M.C., Chazin, V.R., Hung, G., Udove, J.A., Markowicz, M., Danyluk, J., Godolphin, W., Sliwkowski, M., Akita, R. & et al. (1993). Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*, Vol. 53, No. 20, pp. 4960-70.
- Press, M.F., Slamon, D.J., Flom, K.J., Park, J., Zhou, J.Y. & Bernstein, L. (2002). Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used

- assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*, Vol. 20, No. 14, pp. 3095-105.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B. & Sklar, L.A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 265-266, pp. 138-42.
- Putti, T.C., El-Rehim, D.M., Rakha, E.A., Paish, C.E., Lee, A.H., Pinder, S.E. & Ellis, I.O. (2005). Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol*, Vol. 18, No. 1, pp. 26-35.
- Qian, X., Dougall, W.C., Fei, Z. & Greene, M.I. (1995). Intermolecular association and transphosphorylation of different neu-kinase forms permit SH2-dependent signaling and oncogenic transformation. *Oncogene*, Vol. 10, No. 1, pp. 211-9.
- Radisavljevic, Z. (2004). Inactivated tumor suppressor Rb by nitric oxide promotes mitosis in human breast cancer cells. *J Cell Biochem*, Vol. 92, No. 1, pp. 1-5.
- Ramírez-Ugalde, M.T., Martínez-Saíd, H., Lara-Medina, F. & C., R.-V. (2003). Cáncer de mama. En: *Procedimientos Medicoquirúrgicos. Manual de Oncología*. 2da edn.: McGraw-hill Interamericana. pp. 472-492.
- Reik, W. & Lewis, A. (2005). Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet*, Vol. 6, No. 5, pp. 403-10.
- Reinholz, M.M., Nibbe, A., Jonart, L.M., Kitzmann, K., Suman, V.J., Ingle, J.N., Houghton, R., Zehentner, B., Roche, P.C. & Lingle, W.L. (2005). Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res*, Vol. 11, No. 10, pp. 3722-32.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, Vol. 414, No. 6859, pp. 105-11.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W. & Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 5, No. 2, pp. 227-41.
- Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, No. 18, pp. 10014-9.
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A. & Jones, P.A. (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, Vol. 27, No. 11, pp. 2291-8.
- Rockhill, B., Spiegelman, D., Byrne, C., Hunter, D.J. & Colditz, G.A. (2001). Validation of the Gail et al. model of breast cancer risk prediction and implications for chemoprevention. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 93, No. 5, pp. 358-66.
- Rodríguez, J.E., Mestres, M.D., Segarra, N.V., Solá, A.B., Baselga-Torres, J.M., Grau de Castro, J.J., Jiménez, M.M. & Díaz-Rubio García, E. (2000). Diagnóstico de extensión y estrategia terapéutica. En: *Medicina Interna*. Rozman, F. (Ed.) 14 edn. Madrid: Harcourt. pp. 1320-1335.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N. & Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, Vol. 353, No. 16, pp. 1673-84.

- Ross, J.S. & Fletcher, J.A. (1998a). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist*, Vol. 3, No. 4, pp. 237-252.
- Ross, J.S. & Fletcher, J.A. (1998b). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, Vol. 16, No. 6, pp. 413-28.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Symmans, W.F., Puztai, L. & Hortobagyi, G.N. (2004). Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*, Vol. 3, No. 4, pp. 379-98.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J.S., Hortobagyi, G.N. & Puztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, Vol. 11, No. 16, pp. 5678-85.
- Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A. & Sheer, D. (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 59, No. 7, pp. 1433-6.
- Rudland, P.S., Barraclough, R., Fernig, D.G. & Smith, J.A. (1998). Growth and differentiation of the normal mammary gland and its tumours. *Biochem Soc Symp*, Vol. 63, pp. 1-20.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C. & Russo, I.H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 53, No. 3, pp. 217-27.
- Russo, J., Hu, Y.F., Silva, I.D. & Russo, I.H. (2001). Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech*, Vol. 52, No. 2, pp. 204-23.
- Russo, J. & Russo, I.H. (1987). Development of the human mammary gland. En: *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Neville, M.C. & Daniel, C.W. (Eds.). New York, NY: Plenum. pp. 67-93.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. & Jones, P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, Vol. 9, No. 6, pp. 435-43.
- Sakai, T., Toguchida, J., Ohtani, N., Yandell, D.W., Rapaport, J.M. & Dryja, T.P. (1991). Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*, Vol. 48, No. 5, pp. 880-8.
- Sambrook y Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Sambrook and Russell cites the original paper: Warburg, O. y Christian W. (1942). "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase". *Biochem. Z.* Vol. 310: pp. 384-421.)
- Sauter, E.R., Ehya, H., Schlatter, L. & MacGibbon, B. (2004). Ductoscopic cytology to detect breast cancer. *Cancer J*, Vol. 10, No. 1, pp. 33-41; discussion 15-6.
- Schedin, P. (2006). Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, No. 4, pp. 281-91.
- Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., Bergman, Y., Simon, I. & Cedar, H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*, Vol. 39, No. 2, pp. 232-6.

- Schmitt, C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*, Vol. 3, No. 4, pp. 286-95.
- Seaberg, R.M. & van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*, Vol. 26, No. 3, pp. 125-31.
- Seagroves, T.N., Lydon, J.P., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K. & Rosen, J.M. (2000). C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol Endocrinol*, Vol. 14, No. 3, pp. 359-68.
- Secretaría de Salud (2002). Compendio de cáncer 2002. Registro histopatológico de neoplasias malignas. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Dirección General de Epidemiología. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.
- Secretaría de Salud (2003). NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. *Diario Oficial de la Federación*.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J. & Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, Vol. 439, No. 7072, pp. 84-8.
- Shah, N.G., Choksi, T.J., Patel, D.D., Vora, H.H., Ghosh, N., Trivedi, T.I. & Trivedi, K.A. (2002). Telomerase activity in breast cancer in Western India (Gujarat). *Int J Biol Markers*, Vol. 17, No. 1, pp. 49-55.
- Shaked, Y. & Kerbel, R.S. (2007). Antiangiogenic strategies on defense: on the possibility of blocking rebounds by the tumor vasculature after chemotherapy. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 15, pp. 7055-8.
- Shapiro, S., Strax, P. & Venet, L. (1966). Evaluation of periodic breast cancer screening with mammography. Methodology and early observations. *JAMA*, Vol. 195, No. 9, pp. 731-8.
- Shay, J.W. & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, Vol. 33, No. 5, pp. 787-91.
- Shchors, K. & Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*, Vol. 67, No. 15, pp. 7059-61.
- Shelfer, L. (2009). The alchemy of jargon: etymologies of urologic neologisms. Number 5: oncology and its vocabulary. *The Prostate*, Vol. 69, No. 13, pp. 1369 - 1371.
- Shen, K.W., Wu, J., Lu, J.S., Han, Q.X., Shen, Z.Z., Nguyen, M., Barsky, S.H. & Shao, Z.M. (2001). Fiberoptic ductoscopy for breast cancer patients with nipple discharge. *Surg Endosc*, Vol. 15, No. 11, pp. 1340-5.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Jr., Badve, S. & Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, Vol. 8, No. 5, pp. R59.
- Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, Vol. 79, No. 4, pp. 551-5.
- Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, Vol. 13, No. 12, pp. 1501-12.
- Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R. & Muller, W.J. (1994). Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol Cell Biol*, Vol. 14, No. 11, pp. 7068-77.

- Silva, J.M., Silva, J., Sanchez, A., Garcia, J.M., Dominguez, G., Provencio, M., Sanfrutos, L., Jareno, E., Colas, A., Espana, P. & Bonilla, F. (2002). Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res*, Vol. 8, No. 12, pp. 3761-6.
- Simpson, J.F. & Page, D.L. (2000). The p53 tumor suppressor gene in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol*, Vol. 156, No. 1, pp. 5-6.
- Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T. & Lakhani, S.R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*, Vol. 205, No. 2, pp. 248-54.
- SINAIS (2005). Mortalidad en mujeres (estandarizada por edad) por enfermedades no transmisibles, según entidad federativa de residencia habitual. *Dirección General de Información en Salud*. Disponible en: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>.
- SINAIS (2007). Diez Principales Causas de Mortalidad en Mujeres, Estados Unidos Mexicanos. *Dirección General de Información en Salud*. Disponible en: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, Vol. 63, No. 18, pp. 5821-8.
- Singletary, E., Lieberman, R., Atkinson, N., Sneige, N., Sahin, A., Tolley, S., Colchin, M., Bevers, T., Stelling, C., Fornage, B., Fritsche, H., Hittelman, W., Kelloff, G. & Lippman, S.M. (2000). Novel translational model for breast cancer chemoprevention study: accrual to a presurgical intervention with tamoxifen and N-[4-hydroxyphenyl] retinamide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 9, No. 10, pp. 1087-90.
- Smalley, M. & Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer*, Vol. 3, No. 11, pp. 832-44.
- Smalley, M.J. & Clarke, R.B. (2005). The mammary gland "side population": a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 10, No. 1, pp. 37-47.
- Smith, G.H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development*, Vol. 132, No. 4, pp. 681-7.
- Smith, G.H. & Boulanger, C.A. (2003). Mammary epithelial stem cells: transplantation and self-renewal analysis. *Cell Prolif*, Vol. 36 Suppl 1, pp. 3-15.
- Smith, G.H., Strickland, P. & Daniel, C.W. (2002). Putative epithelial stem cell loss corresponds with mammary growth senescence. *Cell Tissue Res*, Vol. 310, No. 3, pp. 313-20.
- Smits, V.A. & Medema, R.H. (2001). Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1519, No. 1-2, pp. 1-12.
- Soderqvist, G., von Schoultz, B., Tani, E. & Skoog, L. (1993). Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 168, No. 3 Pt 1, pp. 874-9.
- Somani, A., Hwang, J.S., Chaiwun, B., Tse, G.M., Lui, P.C. & Tan, P.H. (2008). Fine needle aspiration cytology in young women with breast cancer: diagnostic difficulties. *Pathology*, Vol. 40, No. 4, pp. 359-64.
- Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Wu, G.S., Licht, J.D., Weber, B.L. & El-Deiry, W.S. (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-

- suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature*, Vol. 389, No. 6647, pp. 187-90.
- Sorlie, T. (2004). Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*, Vol. 40, No. 18, pp. 2667-75.
- Sorlie, T. (2009). Introducing molecular subtyping of breast cancer into the clinic? *J Clin Oncol*, Vol. 27, No. 8, pp. 1153-4.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. & Borresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, No. 19, pp. 10869-74.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L. & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, No. 14, pp. 8418-23.
- Sotiriou, C., Neo, S.Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L. & Liu, E.T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, No. 18, pp. 10393-8.
- Spiegelman, D., Colditz, G.A., Hunter, D. & Hertzmark, E. (1994). Validation of the Gail *et al.* model for predicting individual breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 86, No. 8, pp. 600-7.
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet*, Vol. 347, No. 9012, pp. 1377-81.
- Sternlicht, M.D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 17, pp. 463-516.
- Stetler-Stevenson, W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*, Vol. 103, No. 9, pp. 1237-41.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I. & Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, Vol. 439, No. 7079, pp. 993-7.
- Stingl, J., Raouf, A., Emernan, J.T. & Eaves, C.J. (2005). Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 10, No. 1, pp. 49-59.
- Strax, P., Venet, L., Shapiro, S. & Gross, S. (1967). Mammography and clinical examination in mass screening for cancer of the breast. *Cancer*, Vol. 20, No. 12, pp. 2184-8.
- Stuelten, C.H., DaCosta Byfield, S., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler-Stevenson, W.G. & Roberts, A.B. (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci*, Vol. 118, No. Pt 10, pp. 2143-53.
- Sudakin, V., Chan, G.K. & Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, Vol. 154, No. 5, pp. 925-36.
- Sukumar, S. (2009). Methylation array on synchronous epithelial tissue, isolated by laser capture microdissection: normal, DCIS and invasive carcinoma lesions (*com. pers.*).
- Suzuki, M.M. & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, Vol. 9, No. 6, pp. 465-76.

- Swift-Scanlan, T., Blackford, A., Argani, P., Sukumar, S. & Fackler, M.J. (2006). Two-color quantitative multiplex methylation-specific PCR. *Biotechniques*, Vol. 40, No. 2, pp. 210-9.
- Taborga, M., Corcoran, K.E., Fernandes, N., Ramkissoon, S.H. & Rameshwar, P. (2007). G-coupled protein receptors and breast cancer progression: potential drug targets. *Mini Rev Med Chem*, Vol. 7, No. 3, pp. 245-51.
- Tajima, S. & Suetake, I. (1998). Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *J Biochem*, Vol. 123, No. 6, pp. 993-9.
- Thomson, C.S., Brewster, D.H., Dewar, J.A. & Twelves, C.J. (2004). Improvements in survival for women with breast cancer in Scotland between 1987 and 1993: impact of earlier diagnosis and changes in treatment. *Eur J Cancer*, Vol. 40, No. 5, pp. 743-53.
- Tice, J.A., Miike, R., Adduci, K., Petrakis, N.L., King, E. & Wrensch, M.R. (2005). Nipple aspirate fluid cytology and the Gail model for breast cancer risk assessment in a screening population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 14, No. 2, pp. 324-8.
- Tierney, A.J., Leonard, R.C.F., Taylor, J., Closs, S.J., Chetty, U. & Rodger, A. (1991). Side effects expected and experienced by women receiving chemotherapy for breast cancer. *BMJ*, Vol. 302, pp. 272-3.
- Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J. & Kallioniemi, O.P. (1998). Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, Vol. 21, No. 3, pp. 177-84.
- Tlsty, T.D. & Hein, P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 11, No. 1, pp. 54-9.
- Tovey, S.M., Brown, S., Doughty, J.C., Mallon, E.A., Cooke, T.G. & Edwards, J. (2009). Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours. *Br J Cancer*, Vol. 100, No. 5, pp. 680-3.
- Tsutsumi, S. & Neckers, L. (2007). Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci*, Vol. 98, No. 10, pp. 1536-9.
- UCSC (2009). UCSC Genome Browser Website. Disponible en: <http://genome.ucsc.edu/>.
- Uehara, J., Nazario, A.C., Rodrigues de Lima, G., Simoes, M.J., Juliano, Y. & Gebrim, L.H. (1998). Effects of tamoxifen on the breast in the luteal phase of the menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet*, Vol. 62, No. 1, pp. 77-82.
- Umbricht, C.B., Sherman, M.E., Dome, J., Carey, L.A., Marks, J., Kim, N. & Sukumar, S. (1999). Telomerase activity in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Oncogene*, Vol. 18, No. 22, pp. 3407-14.
- Valdes, E.K., Boolbol, S.K., Cohen, J.M., Balassanian, R. & Feldman, S.M. (2006). Clinical experience with mammary ductoscopy. *Ann Surg Oncol*.
- Van de Rijn, M., Perou, C.M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D. & Brown, P. (2002). Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*, Vol. 161, No. 6, pp. 1991-6.
- Van Dyke, T. (2007). p53 and tumor suppression. *N Engl J Med*, Vol. 356, No. 1, pp. 79-81.
- Vera-Hernández, A., Jesús Enrique Chong Quero, Lorenzo Leija Salas, Yahir Hernández Mier & Marchal, C. (2001). Hipertermia electromagnética, una alternativa para el

- tratamiento del cáncer: antecedentes, aspectos físicos and biológicos. *Revista Mexicana de Ingenieria Biomedica*, Vol. 22, No. 2, pp. 78-88
- Verkman, A.S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, Vol. 118, No. Pt 15, pp. 3225-32.
- Verkman, A.S. (2008). Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med*, Vol. 10, pp. e13.
- Verkman, A.S. (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol*, No. 190, pp. 359-81.
- Vidal, A. & Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, Vol. 247, No. 1-2, pp. 1-15.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y. & Fuks, F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, Vol. 439, No. 7078, pp. 871-4.
- Visvanathan, K., Sukumar, S. & Davidson, N.E. (2006). Epigenetic biomarkers and breast cancer: cause for optimism. *Clin Cancer Res*, Vol. 12, No. 22, pp. 6591-3.
- Vogel, C., Hager, C. & Bastians, H. (2007). Mechanisms of Mitotic Cell Death Induced by Chemotherapy-Mediated G2 Checkpoint Abrogation. *Cancer Res*, Vol. 67, No. 1, pp. 339-45.
- Vogel, P.M., Georgiade, N.G., Fetter, B.F., Vogel, F.S. & McCarty, K.S., Jr. (1981). The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol*, Vol. 104, No. 1, pp. 23-34.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, Vol. 274, No. 5288, pp. 784-7.
- Wang, J., Tanji, N., Kikugawa, T., Shudou, M., Song, X. & Yokoyama, M. (2007). Expression of aquaporin 3 in the human prostate. *Int J Urol*, Vol. 14, No. 12, pp. 1088-92; discussion 1092.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. & Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, Vol. 39, No. 4, pp. 457-66.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* Vol. 292, pp. 727-730.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, Vol. 81, No. 3, pp. 323-30.
- Weisenthal, L.M. & Lippman, M.E. (1985). Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treat Rep*, Vol. 69, No. 6, pp. 615-32.
- Welch DR & LL., W. (1998). Genetic and epigenetic regulation of human breast cancer progression and metastasis. *Endocrine Related Cancer*, Vol. 5, pp. 155-197.
- Welch, D.R., Steeg, P.S. & Rinker-Schaeffer, C.W. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res*, Vol. 2, No. 6, pp. 408-16.
- Welsh, P.L. & King, M.C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*, Vol. 10, No. 7, pp. 705-13.

- Welm, B.E., Tepera, S.B., Venezia, T., Graubert, T.A., Rosen, J.M. & Goodell, M.A. (2002). Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol*, Vol. 245, No. 1, pp. 42-56.
- Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, Vol. 91, No. 4, pp. 439-42.
- Wicha, M.S., Liu, S. & Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 4, pp. 1883-90; discussion 1895-6.
- Widschwendter, M. & Jones, P.A. (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, Vol. 21, No. 35, pp. 5462-82.
- Widschwendter, M. & Menon, U. (2006). Circulating methylated DNA: a new generation of tumor markers. *Clin Cancer Res*, Vol. 12, No. 24, pp. 7205-8.
- Widschwendter, M., Siegmund, K.D., Muller, H.M., Fiegl, H., Marth, C., Muller-Holzner, E., Jones, P.A. & Laird, P.W. (2004). Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res*, Vol. 64, No. 11, pp. 3807-13.
- Williams, J.M. & Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol*, Vol. 97, No. 2, pp. 274-90.
- Winer, E.P., Hudis, C., Burstein, H.J., Chlebowski, R.T., Ingle, J.N., Edge, S.B., Mamounas, E.P., Gralow, J., Goldstein, L.J., Pritchard, K.I., Braun, S., Cobleigh, M.A., Langer, A.S., Perotti, J., Powles, T.J., Whelan, T.J. & Browman, G.P. (2002). American society of clinical oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J Clin Oncol*, Vol. 20, No. 15, pp. 3317-27.
- Wiseman, B.S. & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, Vol. 296, No. 5570, pp. 1046-9.
- Wistuba, II, Behrens, C., Milchgrub, S., Syed, S., Ahmadian, M., Virmani, A.K., Kurvari, V., Cunningham, T.H., Ashfaq, R., Minna, J.D. & Gazdar, A.F. (1998). Comparison of features of human breast cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res*, Vol. 4, No. 12, pp. 2931-8.
- Wong, S.Y. & Hynes, R.O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*, Vol. 5, No. 8, pp. 812-7.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F. & Rosen, J.M. (2005). On mammary stem cells. *J Cell Sci*, Vol. 118, No. Pt 16, pp. 3585-94.
- Wu, H., Chen, Y., Liang, J., Shi, B., Wu, G., Zhang, Y., Wang, D., Li, R., Yi, X., Zhang, H., Sun, L. & Shang, Y. (2005). Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature*, Vol. 438, No. 7070, pp. 981-7.
- Wulfing, P., Borchard, J., Buerger, H., Heidl, S., Zanker, K.S., Kiesel, L. & Brandt, B. (2006). HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, Vol. 12, No. 6, pp. 1715-20.
- Xiong, Z. & Laird, P.W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, Vol. 25, No. 12, pp. 2532-4.
- Yager, J.D. & Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*, Vol. 354, No. 3, pp. 270-82.

- Yang, X., Yan, L. & Davidson, N.E. (2001). DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, Vol. 8, No. 2, pp. 115-27.
- Yao, J., Weremowicz, S., Feng, B., Gentleman, R.C., Marks, J.R., Gelman, R., Brennan, C. & Polyak, K. (2006). Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 8, pp. 4065-78.
- Yoo, C.B. & Jones, P.A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 5, No. 1, pp. 37-50.
- Young, L.J., Medina, D., DeOme, K.B. & Daniel, C.W. (1971). The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Exp Gerontol*, Vol. 6, No. 1, pp. 49-56.
- Yu, H. (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell*, Vol. 27, No. 1, pp. 3-16.
- Zanardi, S., Serrano, D., Argusti, A., Barile, M., Puntoni, M. & Decensi, A. (2006). Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer*, Vol. 13, No. 1, pp. 51-68.
- Zeps, N., Bentel, J.M., Papadimitriou, J.M., D'Antuono, M.F. & Dawkins, H.J. (1998). Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation*, Vol. 62, No. 5, pp. 221-6.
- Zeps, N., Dawkins, H.J., Papadimitriou, J.M., Redmond, S.L. & Walters, M.I. (1996). Detection of a population of long-lived cells in mammary epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res*, Vol. 286, No. 3, pp. 525-36.
- Zhang, P. (1999). The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 11, No. 6, pp. 655-62.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A. & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, Vol. 125, No. 6, pp. 1137-49.
- Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C. & Chen, Y. (2006). Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*, Vol. 80, No. 3, pp. 267-74.
- Zon, R.T., Goss, E., Vogel, V.G., Chlebowski, R.T., Jatoi, I., Robson, M.E., Wollins, D.S., Garber, J.E., Brown, P. & Kramer, B.S. (2009). American society of clinical oncology policy statement: the role of the oncologist in cancer prevention and risk assessment. *J Clin Oncol*, Vol. 27, No. 6, pp. 986-93.

ANEXO 1

GLOSARIO

5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina). Agente hipometilador que hipometila el DNA mediante la inhibición de la enzima DNA metiltransferasa.

Acetato de megestrol. Progestágeno que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas ADH. Hiperplasia ductal atípica.

Alelo. Es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen. Al ser la mayoría de los mamíferos diploides estos poseen dos alelos de cada gen, uno de ellos procedente del padre y el otro de la madre. Cada par de alelos se ubica en igual locus o lugar del cromosoma.

Anafase. Es una fase de la mitosis y meiosis en la que los cromosomas se separan en una célula eucariota. Cada cromátida se desplaza al polo opuesto de la célula, gracias al huso mitótico o Meiótico.

Anemia Fanconi. Es una enfermedad hematológica rara, en la que se desarrolla de forma gradual una disminución de las tres series celulares sanguíneas (pancitopenia) eritrocitos (glóbulos rojos), leucocitos (blancos) y plaquetas, durante la infancia, es más frecuente en varones con una relación de 1,3:1.

Angiogénesis. Es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también en un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral.

Antraciclina. Tipo de antibiótico que proviene de ciertos tipos de la bacteria Streptomyces. Las antraciclinas se usan en el tratamiento de muchos tipos de cánceres. Las antraciclinas dañan el DNA de las células cancerosas, provocándoles la muerte.

Apoptosis. Es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente.

Aromatasa. Es una enzima de la superfamilia del citocromo P450 de enzimas, cuya función es la de aromatizar los andrógenos (esto es, incrementar selectivamente su aromaticidad), produciendo estrógenos. Este proceso es un importante factor en el desarrollo sexual.

ATG. Codón que indica el inicio de la transcripción.

Autopsia. Es un procedimiento médico que emplea la disección, con el fin de obtener información anatómica sobre la causa, naturaleza, extensión y complicaciones.

Biopsia. Es procedimiento diagnóstico que consiste en la extracción de una muestra de tejido obtenida por medio de métodos cruentos para examinarla al microscopio.

Cáncer. Nombre dado a las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de cáncer también se pueden diseminar hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático. Las células normales al sentir el contacto con las células vecinas inhiben la reproducción, pero las células malignas no tienen este freno. La mayoría de los cánceres forman tumores pero algunos no (como la leucemia).

Carcinogénesis. Proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas.

Carcinógeno. Agente tanto físico, como químico o biológico, es aquél que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer.

Carcinoma. Es un cáncer que empieza en la piel (células epiteliales) o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

Caspasas. Son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis, la muerte celular programada, de especial relevancia en los procesos morfogénéticos del desarrollo embrionario.

cDNA. DNA complementario.

Cebadores. Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesitan dos para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para la otra hebra. Son de aproximadamente 20 nucleótidos, porque es la cantidad necesaria para que probabilísticamente coincida en un sitio de la cadena de DNA.

Célula mioepitelial. En la base del complejo areola-pezones de la mama se localizan ciertos elementos conocidos como células mioepiteliales, estrictamente epiteliales en cuanto a su origen, aunque con la particularidad de que son capaces de moverse a la manera de las fibras musculares. Estas células mioepiteliales provocan la salida de la leche almacenada en los galatoforos y la erección del pezón ante estímulos como succión, roce, tacto y frío.

Células endoteliales. Es un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

Ciclina. Son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular que forman complejos con quinasas dependientes de ciclinas activando en estas últimas su función de quinasas. La concentración de las ciclinas varía con el ciclo celular; cuando su concentración es baja la función de su correspondiente quinasas dependiente de ciclina es inhibida.

Ciclofosfamida. Medicamento que se usa para tratar muchos tipos de cáncer y que está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. También se usa para tratar ciertas

enfermedades de riñón infantiles. La ciclofosfamida se une al DNA de las células y puede destruir células cancerosas. Es un tipo de alquilante. También se llama CTX y Cytosan.

Cinetocoro. Es una estructura proteica donde se anclan los microtúbulos (MTs) del huso mitótico durante los procesos de división celular (meiosis y mitosis). Está localizado en una zona específica del cromosoma, el centrómero.

Citocina. También llamados citoquinas o interleucinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación inter-celular, son producidas por varios tipos celulares, principalmente por el Sistema Inmune. Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyésis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.

Citocinesis. También llamada citodiéresis es la separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular. Se produce después de la cariocinesis, y al final de la telofase, en la división celular mitótica. Su mecanismo es distinto en la célula animal (por estrangulamiento) o vegetal (por tabicación).

Citología. Estudio de las células mediante un microscopio.

Clon. Conjunto de individuos genéticamente idénticos que descienden de un mismo individuo por mecanismos de reproducción asexual.

Colágeno. Molécula proteica que forma fibras, las fibras colágenas. Estas se encuentran en todos los organismos pluricelulares. Son secretadas por las células del tejido conjuntivo como los fibroblastos, así como por otros tipos celulares. Es el componente más abundante de la piel y de los huesos, cubriendo un 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos.

Conducto mamario. También conocido como conducto galactóforo, es uno de los numerosos conductos que transportan leche desde los lóbulos mamarios al pezón.

Cromátida. Es una de las unidades longitudinales de un cromosoma duplicado, unida a su cromátida hermana por el centrómero. Cada cromátida lleva varios alelos, es decir cada una de

las características de su progenitor y es visible en la metafase de la mitosis y representa a los pre-cromosomas hijos. En la anafase de la mitosis, las cromátidas se separan y se convierten en cromosomas hijos. Son idénticas llevan la misma información, ya que se han formado una a partir de la otra.

Cromatina. Conjunto de DNA, histonas y proteínas no histónicas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.

Cromosoma. Llamado así a cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares (mitosis y meiosis).

DCIS progresivo. Carcinoma ductal *in situ* adyacente a un carcinoma ductal invasivo, que podría progresar a su versión invasora.

DCIS. Carcinoma ductal *in situ*.

Delección. Es un tipo especial de mutación que consiste en la pérdida de un fragmento de DNA de un cromosoma. La delección de un gen o de parte de un gen puede ocasionar una enfermedad o una anomalía. La delección de material genético puede afectar desde un solo nucleótido (delección puntual) a grandes regiones visibles citogenéticamente

Deoxinucleótido. Son los monómeros que constituyen el DNA. Y poseen la misma estructura que los nucleótidos : una base nitrogenada (un compuesto cíclico con átomos de nitrógeno), un grupo fosfato y una pentosa (monosacárido de cinco carbonos), en este caso la desoxirribosa. Cuando la molécula contiene tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa se le conoce como deoxinucleótido trifosfato (dNTPs) y sirve como sustrato para polimerizar nuevo DNA.

DNA polimerasa. Enzima que interviene en la replicación del DNA para dar a cada célula hija una copia del DNA original en el proceso de la mitosis. Llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de DNA emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del DNA molde.

DNA. El ácido desoxirribonucleico es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, siendo el responsable de su transmisión hereditaria.

Ductoscopia (endoscopia mamaria). Método por el que se examina el revestimiento de los conductos de la mama para buscar tejido anormal. Un tubo muy delgado, flexible y liviano adherido a una cámara se inserta a través del pezón y recorre los conductos de la mama en la parte más profunda. Durante el procedimiento se pueden extraer muestras de tejido y líquidos.

Elastina. Proteína estructural que forma parte de la matriz celular, como la piel; rica en prolina y glicina, y a diferencia del colágeno posee muy poca hidroxiprolina y nada de hidroxilisina.

Eosina. Colorante, en forma de polvo rojo cristalino, de uso ampliamente extendido en estudios biológico e histológico. La coloración resultante de la tinción con eosina es rosada-anaranjada para citoplasmas, y rojo intenso en el caso de los eritrocitos.

Epigenética. Hace referencia a los mecanismos de regulación genética que no implican cambios en la secuencias de DNA.

Estrógenos. Hormonas sexuales de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales. Los estrógenos inducen fenómenos de proliferación celular sobre los órganos, principalmente endometrio, mama y el mismo ovario.

Estroma. Armazón o entramado de un órgano, esto es su matriz intercelular (con sus componentes fibrilares y sustancia fundamental) además de aquellos elementos celulares conectivos que sintetizan la matriz. La estroma es tejido conjuntivo laxo.

Eucromatina. Forma de la cromatina ligeramente compactada, con una gran concentración de genes, y a menudo (no siempre) se encuentra en transcripción activa. A diferencia de la heterocromatina, se encuentra tanto en eucariotas como en procariotas.

Exemestano. Medicamento usado para tratar el cáncer de mama (seno) avanzado y para prevenir el cáncer de mama recurrente en las mujeres posmenopáusicas que ya han sido tratadas con tamoxifeno. También está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. El exemestano produce una disminución en la cantidad de estrógeno que el cuerpo elabora. Es un tipo de inhibidor de la aromatasa. También se llama Aromasin.

Exón. Regiones de un gen que no son separadas del RNA maduro. En los genes que codifican una proteína, son los exones los que contienen la información para producir la proteína codificada en el gen. En estos casos, cada exón codifica una porción específica de la proteína completa, de manera que el conjunto de exones forma la *región codificante* del gen. En eucariotas los exones de un gen están separados por regiones largas de DNA (llamadas intrones) que no codifican.

Expresión genética. Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Fenotipo. Se denomina fenotipo a la expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales. Es importante destacar que el fenotipo no puede definirse como la "manifestación visible" del genotipo, pues a veces las características que se estudian no son visibles en el individuo, como es el caso de la presencia de una enzima.

Fibrinógeno. Proteína soluble del plasma sanguíneo precursor de la fibrina, su longitud es de 46 nm, su peso 340 kDa.

Fibroadenoma. Tumor benigno más común de la mama femenina. Como su nombre indica, es una neoplasia formada por el tejido fibroso y glandular.

Fibroblasto. Tipo de célula residente del tejido conectivo propiamente dicho, ya que nace y muere allí. Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales.

Fibronectina. Es una glicoproteína dimerica presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales compuesta por dos subunidades muy largas unidas por puentes disulfuro situados cerca del extremo carboxilo.

Fibrosis. Formación o desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo, en contraposición a la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido. La fibrosis se produce por un proceso inflamatorio crónico, lo que desencadena un aumento en la producción y deposición de Matriz Extracelular.

Formato FASTA. Formato de fichero informático basado en texto, utilizado para representar secuencias bien de ácidos nucleicos, bien de péptido, y en el que los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra.

Fulvesrant. Medicamento que inhibe los efectos de la hormona estrogénica. Se utiliza para tratar el cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas.

Ganglios o nódulos linfáticos. Estructuras nodulares que forman parte del sistema linfático, formando agrupaciones en forma de racimos.

Gemelos monocigóticos. Caso en que un embrión originado en una fecundación típica, a partir de un único óvulo y un único espermatozoide, se escinde accidentalmente en dos durante las primeras fases de su desarrollo, en un proceso que debe biológicamente considerarse de multiplicación asexual. La bipartición del embrión se produce acompañando a la proliferación celular, en la que sólo está implicada la mitosis, un proceso de reparto de material hereditario que distribuye copias idénticas de la dotación genética. Como consecuencia, los gemelos monocigóticos comparten inicialmente, de manera absoluta, el 100% de sus genes.

Gen supresor tumoral. Gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y normalmente inhiben la proliferación celular excesiva.

Gen. Secuencia lineal organizada de nucleótidos en la molécula de DNA (o RNA en el caso de algunos virus), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, normalmente proteínas, pero también mRNA, RNA ribosómico, RNA de transferencia y RNA pequeños.

Genética. Campo de las ciencias biológicas que trata de comprender cómo la herencia biológica es transmitida de una generación a la siguiente, y cómo se efectúa el desarrollo de las características que controlan estos procesos.

Genotipo. Contenido genético (el genoma específico) de un individuo, en forma de DNA. Junto con la variación ambiental que influye sobre el individuo, codifica el fenotipo del individuo. De otro modo, el genotipo puede definirse como el conjunto de genes de un organismo y el fenotipo como el conjunto de rasgos de un organismo.

Hematoxilina. Colorante utilizado en histología para teñir los componentes aniónicos (ácidos) de los tejidos, a los que da una coloración violeta. Tiñe intensamente los núcleos de las células, dado que estos contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos.

Heterocromatina. Forma inactiva condensada localizada sobre todo en la periferia del núcleo, que se tiñe fuertemente con las coloraciones. La heterocromatina puede ser de dos tipos diferentes: la constitutiva, idéntica para todas las células del organismo y que carece de información genética, incluye a los telómeros y centrómeros del cromosoma que no expresan su DNA; y la facultativa, diferente en los distintos tipos celulares, contiene información sobre todos aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento. Incluye al DNA satélite y al corpúsculo de Barr.

Hialuronidasa. Enzima que hidroliza el ácido hialurónico de la matriz extracelular.

Hidrocortisona. Principal glucocorticoide segregado por la corteza suprarrenal humana y el esteroide más abundante en la sangre periférica, si bien también se forman cantidades menores de corticosterona.

Hiperplasia. Aumento de tamaño de un órgano o de un tejido, debido a que sus células han aumentado en número. Puede producirse en los tejidos cuyas células se pueden multiplicar.

Ocurre en forma fisiológica en las glándulas mamarias durante la lactancia, la hiperplasia del endometrio en el ciclo menstrual, la FSH hace crecer el endometrio y los estrógenos ováricos, el 14^{vo} día, la progesterona detiene este crecimiento.

Hipoxia. Trastorno en el cual el cuerpo por completo (hipoxia generalizada), o una región del cuerpo (hipoxia de tejido), se ve privado del suministro adecuado de oxígeno.

Histonas. Proteínas básicas, de baja masa molecular, muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariontes. Forman la cromatina junto con el DNA, sobre la base de unas unidades conocidas como nucleosomas.

IDC. Carcinoma ductal invasivo.

Inmunohistoquímica. Estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina. El complejo antígeno - anticuerpo así formado, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc), permite ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas a estudiar, logrando la identificación de marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, con lo que se determina el tipo de célula involucrado en la muestra.

Insulina. Hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo llamado proinsulina.

Integrina. Superfamilia de glicoproteínas que participan mayormente en la unión de las células con la matriz extracelular. Aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula.

Interfase. Período comprendido entre divisiones celulares. Es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi el 95% del ciclo, transcurre entre dos mitosis y comprende tres etapas: G₁, S y G₂.

Laminina. Glicoproteína que forma parte de la lámina basal asociada a otras proteínas como el colágeno, entactina, proteoglucanos y fibronectinas. Tiene una longitud de 120 nm, y atraviesa toda las capas de la lámina basal. Su función sería la de anclar las células epiteliales a la lámina densa pues tiene sitios de unión para moléculas de integrinas de la membrana celular de la base celular.

Leucocitos. También llamados glóbulos blancos, son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune, así intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos). Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático.

Lobulillo. Parte pequeña de un lóbulo mamario. Un lobulillo de la mama es una glándula que elabora leche.

Lumen. Cavidad o canal dentro de un tubo o un órgano con forma de tubo; por ejemplo, un vaso sanguíneo, el intestino o un conducto mamario.

Lumpectomía. Tipo de cirugía que se pueden realizar para la resección de un tumor de mama. Corresponde al tipo de cirugías conservadoras, es decir, en donde no se reseca la totalidad de la mama (mastectomía).

Macrófagos. Células del sistema inmunitario, que se localizan en los tejidos procedentes de la emigración desde la sangre a partir de un tipo de leucocito llamado monocito.

Macromastia. Mama normal, pero de volumen excesivo.

Mastectomía. Cirugía para extraer la mama (o tanto como sea posible del tejido de la mama).

Mastografía. También llamado mamografía, es el uso de una radiografía o una computadora para crear una imagen de la mama.

Membrana basal. Capa acelular de sostén de espesor variable y que se encuentra en la base de los tejidos epiteliales.

Menarquia. Primer episodio de sangrado vaginal de origen menstrual, o primera hemorragia menstrual de la mujer.

Menopausia. Cese permanente de la menstruación y tiene correlaciones fisiológicas, con la declinación de la secreción de estrógenos por pérdida de la función folicular. Es un paso dentro de un proceso lento y largo de envejecimiento reproductivo.

Mesenquima. Tejido del organismo embrionario, de tipo conjuntivo laxo: con una abundante matriz extracelular, compuesta por fibras delgadas y relativamente pocas células (aunque la celularidad es muy variable). El mesénquima hace referencia también a los tejidos de sostén o de relleno que conforman los órganos.

Metafase. Es la fase de la mitosis y de la meiosis que sucede a la profase donde se pierde la envoltura y aparecen las microtubillas.

Metaloproteína de matriz. Proteína que contiene un ion metálico como cofactor y cuya función es muy variada en las células, actuando como enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento, y en la transducción de señales.

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 de dicha metástasis.

Metiltransferasa de DNA. Enzima (una proteína que acelera reacciones químicas en el cuerpo) que une un grupo metílico al DNA. Un grupo metílico es un grupo químico que contiene una molécula de carbono y tres moléculas de hidrógeno. También se llama metilasa de DNA.

Metotrexato. Medicamento que se usa para tratar ciertos tipos de cáncer, la artritis reumatoide y afecciones graves de la piel, como la psoriasis. El metotrexato impide que las células elaboren DNA y podría destruir las células cancerosas. Es un tipo de antimetabolito. También se llama ametopterina, MTX, y Rheumatrex.

Microarreglos. Soportes sólidos en los cuales se encuentran inmovilizados, en un área pequeña, de cientos a miles de genes de manera ordenada. Los soportes sólidos pueden ser laminillas de vidrio para microscopio, laminillas de silicon o membranas de nylon. En los microarreglos, el DNA puede ser impreso, depositado o sintetizado directamente sobre la superficie sólida. Esta colección de ácidos nucleicos (blancos) impresos con un orden específico, representan una parte o todos los genes de un organismo. Cada secuencia presente en cada una de las alícuotas depositadas en la superficie sólida corresponde a un gen diferente.

Mitocondria. Orgánulos membranosos que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. Su tamaño varía entre 0.5–10 micrómetros (μm) de diámetro. Las mitocondrias se describen en ocasiones como "generadoras de energía" de las células, debido a que producen la mayor parte del suministro de Adenosín trifosfato (ATP), que se utiliza como fuente de energía química.

Mitosis. Proceso de reparto equitativo del material hereditario (DNA) característico de las células eucarióticas.^[1] Normalmente concluye con la formación de dos núcleos separados (cariocinesis), seguido de la partición del citoplasma (citocinesis), para formar dos células hijas. La mitosis completa, que produce células genéticamente idénticas, es el fundamento del crecimiento, de la reparación tisular y de la reproducción asexual.

Morfogénesis. Es uno de los tres aspectos fundamentales de la biología del desarrollo, junto con el control del crecimiento celular y de la diferenciación celular. La morfogénesis incluye la forma de los tejidos, de los órganos y de los organismos completos y las posiciones de varios tipos de células especializadas.

mRNA. Ácido ribonucleico monocatenario que contiene la información genética procedente del DNA para utilizarse en la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos.

Mutación. Alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia.

Necrosis. Muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Neoplasia. Proceso de proliferación anormal (multiplicarse abundantemente) de células en un tejido u órgano que desemboca en la formación de un neoplasma. Un neoplasma que forma una masa diferenciada se denomina tumor.

Nucleosoma. Estructura que constituye la unidad fundamental y esencial de cromatina, que es la forma de organización del DNA en las eucariotas. Los nucleosomas están formados por un núcleo proteico constituido por un octámero de histonas, proteínas fuertemente básicas y muy conservadas filogenéticamente. El octámero está formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2a, H2b, H3 y H4.

Oncogén. Gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén. Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer.

Ooforectomía. Extirpación de un ovario. Puede ser unilateral, cuando se extirpa únicamente uno de los dos ovarios, o bilateral cuando ambos ovarios son extirpados.

Organogénesis. Conjunto de cambios que permiten que las capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo, se transformen en los diferentes órganos que conforman un organismo.

Organoide. Porción de conducto mamario con todos sus subtipos celulares.

Papiloma. Término general refiriéndose a un tumor benigno de células epiteliales que crece con proyección externa a semejanza de frondas muy pequeñas. En ese contexto, una papila se refiere a la proyección creada por el tumor y no a un tumor creciendo sobre una papila preexistente, como el pezón. Por lo general nacen y crecen desde la piel, conjuntiva, membranas mucosas o conductos glandulares.

Parénquima. Hace referencia a los aspectos fisiológicos de un tejido en el contexto constitutivo que tiene para un órgano tal componente tisular. En otras palabras, se denomina parénquima a aquel tejido que en un órgano, hace de éste, algo funcional.

Patología. Parte de la medicina encargada del estudio de las enfermedades en su más amplio sentido, es decir, como procesos o estados anormales de causas conocidas o desconocidas.

PCR de transcripción reversa. PCR donde el molde inicial es RNA y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la conversión del RNA a un tipo de DNA llamado cDNA (DNA complementario).

PCR en tiempo real. Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de DNA o RNA presentes en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de DNA específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés *melting temperature*). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en técnicas basadas en sondas específicas.

PCR Multiplex. PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares de cebadores en único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de DNA. Consiste en combinar en una única reacción todos pares de cebadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. Sus ventajas: se obtiene la información de varios loci en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de base de datos.

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Profase. Primera fase de la mitosis y de la meiosis. En ella se produce la condensación de todo el material genético (DNA)-que normalmente existe en forma de cromatina condensada

dentro de una estructura altamente ordenada llamada cromosoma- y el desarrollo bipolar del huso mitótico.

Progesterona. Principal progestágeno. Junto con los estrógenos, los progestágenos forman el binomio hormonal femenino por excelencia. Su principal fuente es el ovario (cuerpos lúteos) y la placenta, si bien también pueden sintetizarse en las glándulas adrenales y el hígado.

Prolactina. Hormona segregada por la parte anterior de la hipófisis, la adenohipófisis, que estimula la producción de leche en las glándulas mamarias y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo.

Promotor. Sección de DNA que controla la iniciación de la transcripción del RNA como producto de ese gen.

Proteasa. Enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas.

Proteinasa K. Enzima que degrada las proteínas de las membranas celulares, por ello se le utiliza en los métodos de extracción de ácidos nucleicos de bacterias o células humanas, porque rompe las membranas y degrada las proteínas liberadas al medio.

Protooncogenes. Genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división celular. Codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de otros genes, moléculas de transducción de señales que estimulan la división celular y reguladores del ciclo celular que hacen que la célula progrese a través de este ciclo. Los productos de los protooncogenes pueden localizarse en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo, y sus actividades se controlan de diversas maneras, incluyendo la regulación a nivel transcripcional, traduccional y de modificación de la proteína.

QM-MSP. Análisis de metilación específica y cuantitativa de múltiples genes por PCR en tiempo real.

Quemoquinas. Constituyen una familia compleja de proteínas recientemente identificadas como citoquinas con actividad quimiotáctica y activadora de diferentes tipos celulares del

sistema inmune, que se diferencian de los quimioatrayentes clásicos, en su especificidad, por subtipos particulares de leucocitos.

Quimioterapia neoadyuvante. Quimioterapia es administrada previa a la cirugía, con el fin de reducir el tamaño del tumor.

Quimioterapia. Tratamiento con medicamentos que destruyen las células cancerosas.

Radioterapia. Uso de radiación de alta energía proveniente de rayos X, rayos gamma, neutrones, protones y otras fuentes para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radiación puede venir de una máquina fuera del cuerpo (radioterapia de haz externo) o de un material radiactivo colocado en el cuerpo cerca de las células cancerosas (radioterapia interna). La radioterapia sistémica usa una sustancia radiactiva, como un anticuerpo monoclonal radiomarcado, que circula con la sangre hasta los tejidos de todo el cuerpo. También se llama irradiación y radioterapia.

Receptor celular. Proteínas o glicoproteínas presentes en la membrana plasmática, en las membranas de los organelos o en el citosol celular, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señalizadoras, como las hormonas y los neurotransmisores.

Región UTR. Regiones no traducidas de los genes. Se habla generalmente de un 5'-UTR y de un 3'-UTR, que son las dos partes no traducidas de cada gen, debido a que se encuentran colindando el marco abierto de lectura (u ORF). De este modo, el elemento que está «aguas arriba» del ORF es el 5'-UTR, pues contacta con el ORF mediante el carbono 5' de la desoxirribosa del primer desoxirribonucleótido del ORF (es decir, de la adenosina del codón de inicio de la traducción); y, «aguas abajo», se sitúa el 3'-UTR, pues contacta mediante el carbono 3' del último desoxirribonucleótido del ORF (es decir, el último del codón de stop).

RNA. Ácido ribonucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariontas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus RNA). El RNA celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

S-adenosil L-metionina. Metabolito celular endógeno, donante de grupos metilos en la mayoría de las reacciones biológicas de transmetilación, que participa activamente en el metabolismo de los aminoácidos sulfurados (cistina, cisteína o taurina) y del glutatión, y que está distribuida por todos los tejidos y fluidos corporales.

Señalización endocrina. Señales extracelulares de comunicación intercelular en organismos pluricelulares mediado por hormonas, producidas por células del sistema endocrino y circulan por el torrente sanguíneo hasta alcanzar todos los lugares del cuerpo. Es de respuesta lenta, inespecífica, larga duración y actúa a distancia.

Señalización paracrina. Señales extracelulares de comunicación intercelular en organismos pluricelulares que sólo actúan sobre células diana que se encuentran en la vecindad de las células emisoras, como por ejemplo los neurotransmisores, respuesta local.

Sonda. Oligonucleotido unido a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

Sustitución. Cambio en un solo aminoácido puede no ser importante si es conservativo y ocurre fuera del sitio activo de la proteína. Así, existen las denominadas *mutaciones sinónimas* o "mutaciones silenciosas" en las que la mutación altera la base situada en la tercera posición del codón pero no causa sustitución aminoacídica debido a la redundancia del código genético. El aminoácido insertado será el mismo que antes de la mutación.

SYBR Green. Fluorocromo que se une al DNA de doble cadena, que ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización y es mucho más económico que utilizar sondas específicas.

Tamoxifeno. Medicamento que se usa para tratar ciertos tipos de cáncer de mama en mujeres y hombres. Asimismo, se usa para prevenir el cáncer de mama en las mujeres que padecieron de carcinoma ductal in situ (células anormales en los conductos de la mama) y que tienen un riesgo alto de contraer cáncer de mama. El tamoxifeno también está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. Bloquea los efectos de la hormona estrógeno en la mama. El tamoxifeno es un tipo de antiestrógeno. También se llama citrato de tamoxifeno.

Taxano. Tipo de medicamento que bloquea el crecimiento celular al impedir la mitosis (división celular). Los taxanos interfieren con los microtúbulos (estructuras celulares que ayudan a mover los cromosomas durante la mitosis). Se usan para tratar el cáncer. Un taxano es un tipo de inhibidor mitótico y de antimicrotúbulo.

Telofase. Fase final de la mitosis y meiosis, que sucede a la Anafase.

Telómeros. Extremos de los cromosomas. Son regiones de DNA no codificante, altamente repetitivas, cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas en las células eucariotas, la división celular y el tiempo de vida de las estirpes celulares.

Termociclador. También conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de DNA o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

Transcriptasa reversa. Enzima de tipo DNA-polimerasa, que tiene como función sintetizar DNA de doble cadena utilizando como molde RNA monocatenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa. Esta enzima se encuentra presente en los retrovirus.

Translocación. Transferencia de parte de un cromosoma a otro cromosoma. Este tipo de translocación produce cromosomas modificados y con frecuencia defectuosos.

Trastuzumab. Anticuerpo monoclonal que se une al HER-2 (receptor del factor de crecimiento hormonal humano) y puede destruir las células cancerosas positivas al HER-2. Los anticuerpos monoclonales se producen en el laboratorio y pueden localizar y unirse a sustancias en el cuerpo como a las células cancerosas. El trastuzumab se usa en el tratamiento

del cáncer de (seno) mama que es positivo al HER-2 y que se ha diseminado después del tratamiento con otros medicamentos. Asimismo, se usa con otros medicamentos contra el cáncer para tratar el cáncer de (seno) mama positivo al HER2 después de una cirugía. El trastuzumab también está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. También se llama Herceptin.

Tratamiento con bisulfito de sodio. El tratamiento del DNA genómico con bisulfito de sodio, tiene por finalidad convertir las citosinas no metiladas en uracilo, los que serán convertidos a timina durante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Usando cebadores específicos para secuencias metiladas M y no metiladas U, es posible discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas en las diferentes muestras analizadas.

Tricostatina A. Inhibidor de la desacetilación de histonas.

Ttranslocaciones. Se producen cuando dos cromosomas no homólogos intercambian segmentos cromosómicos.

Tumorogénesis. Formación del tumor primario.

Utilrasonidos. Onda acústica cuya frecuencia está por encima del límite perceptible por el oído humano. Las frecuencias típicas utilizadas para aplicaciones en abdomen pueden ir desde 2,0 MHz a 5,0 MHz mientras que para regiones como mama, musculo-esqueleticas, tiroides, etc., la frecuencias pueden oscilar entre 8,0 MHz a 16,0 MHz.

Vasos capilares. Vasos sanguíneos de menor diámetro, están formados sólo por una capa de tejido, lo que permite el intercambio de sustancias entre la sangre y las sustancias que se encuentran alrededor de ella.

Vitronectina. Proteína adhesiva presente en el plasma y relacionada con la hemostasis al regular la coagulación y fibrinólisis. Entre sus funciones se encuentra a estabilización del inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1.

ANEXO 2

The ELLA Binational Breast Cancer Study: Design, Implementation, and Preliminary Results

María Elena Martínez; Luis Enrique Gutiérrez Millan; Melissa Bondy; Adrian Daneri; María Mercedes Meza; Patricia Thompson; Ivan Anduro Corona; Ma Isabel Aramburo-Rubio; Luz Maria Adriana Balderas Peña; José Adelfo Barragán Ruiz; Abenaa Brewster; Juan Manuel Castro Cervantes; Mario Alberto Chávez Zamudio; Giovanna Cruz; Alicia Del Toro Arreola; Mary E. Edgerton; María Rosa Flores Márquez; Susan Andrea Gutiérrez Rubio; Karin Hahn; Luz Margarita Jiménez Pérez; Ian K. Komenaka; Zoila Areli López Bujanda; Dihui Lu; Gilberto Morgan Villela; James L. Murray; Jesse N. Nodora; Miguel Angel Ortiz Martínez; Laura Pérez Michel; Antonio Quintero Ramos; Aysegul Sahin; Maureen Stewart; Gonzalo Vázquez Camacho; Betsy Wertheim; Rachel Zenuk

Arizona Cancer Center and Mel and Enid Zuckerman College of Public Health, University of Arizona, Tucson, Arizona 85724 (Maria Elena Martinez; Patricia Thompson; Giovanna Cruz; Betsy Wertheim; Rachel Zenuk).

Arizona Cancer Center and Department of Family and Community Medicine, College of Medicine, University of Arizona, Tucson, Arizona 85724 (Jesse N. Nodora)

Maricopa Medical Center, Department of Surgery, Phoenix, Arizona 85008 (Ian K. Komenaka)

University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030 (Abenaa Brewster; Mary E. Edgerton; Karin Hahn; James L. Murray; Aysegul Sahin; Maureen Stewart).

University of North Carolina, Lineberger Cancer Center, Chapel Hill, North Carolina 27599 (Dihui Lu).

Departamento de Investigaciones Científicas and Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico (Luis Enrique Gutiérrez Millan; Areli Lopez Bujanda; Ivan Anduro Corona).

Centro de Investigacion en Alimentacion and Desarrollo, Hermosillo, Sonora, Mexico (Graciela Caire Juvera).

Instituto Mexicano del Seguro Social, Hermosillo, Sonora, Mexico (Ma Isabel Aramburo Rubio).

Departamento de Fisiologia, Centro Universitario de Ciencias de Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico (Adrián Daneri Navarro, Alicia Del Toro Arreola)

Departamento de Salud Publica, Centro Universitario de Ciencias de Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico (Luz Margarita Jiménez Pérez)

Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregon, Sonora, Mexico (Maria Mercedes Meza)

Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco (Gilberto Morgan Villela, Gonzalo Vázquez Camacho, Juan Manuel Castro Cervantes, Luz Maria Adriana Balderas Peña, María Rosa Flores Márquez, José Adelfo Barragán Ruiz, Antonio Quintero Ramos, Susan Andrea Gutiérrez Rubio)

Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad Obregon, Sonora (Laura Pérez Michel, Mario Alberto Chávez Zamudio; Miguel Angel Ortiz Martínez)

Hospital Civil de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico (Ramón Antonio Franco Topete)

Abbreviations

DNA, deoxyribonucleic acid; ER, estrogen receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; FFPE, formalin fixed paraffin embedded; HER2, human epidermal growth factor receptor; HRT, hormone replacement therapy; IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social; NHW, non-Hispanic white, PR, progesterone receptor; SHINE, Southwest Hormone, Insulin, Nutrition, and Exercise Study; SSL, Secured Socket Layer; TMA, tissue microarray; U.S., United States.

ABSTRACT

Breast cancer is the number one cause of total deaths among Hispanic women in the U.S. and in Mexico, it recently became the primary cause of cancer deaths. The ELLA Binational Breast Cancer Study was established in 2006 as a multi-center study to assess patterns of breast tumor markers, clinical characteristics, and their risk factors in women of Mexican descent. This paper describes the design and implementation of the study, and provides a preliminary comparison of the risk factors and clinical markers of the ELLA study participants by country. A risk factor questionnaire and a medical record abstraction form were created; a biobank for DNA and formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tumor tissue were established for the construction of tissue microarrays. Results based on 765 participants (364 in the U.S. and 401 in Mexico) show that differences exist between the two countries, including lower parity and breastfeeding, higher use of oral contraceptives and hormone replacement therapy (HRT), younger age at diagnosis, and a lower proportion of estrogen receptor (ER) negative tumors in U.S. women versus those in Mexico. This is one of the first studies to comprehensively evaluate breast tumor characteristics and epidemiologic risk factors between the U.S. and Mexico.

Medical Subject Headings

Binational study; breast cancer; Hispanics; methods; Mexico; United States