

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAR-4 EN CÁNCER DE MAMA Y
SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO.**

Por

LUIS FERNANDO MÉNDEZ LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunobiología**

Julio, 2009

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAR-4 EN CÁNCER DE MAMA Y SU
ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO.

Comité de tesis

Director de tesis Dr. Pablo Zapata Benavides

Director externo Dra. Martha I. Dávila Rodríguez

Vocal Dra. Diana Reséndez Pérez

Secretario Dr. Moisés Franco Molina

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAR-4 EN CÁNCER DE MAMA Y SU
ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO.

Comité Académico de Maestría

Subdirector de Estudios de Postgrado

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides y en el Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) a cargo de la Dra. Martha Dávila Rodríguez, así como también en los Departamentos de Patología de las Unidades Medicas de Alta Especialidad (UMAE) No.25 y No.23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), especialmente a la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación y permitirme el uso de equipo y laboratorios, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios, al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por brindarme la oportunidad de fungir como becario y facilitarme las instalaciones y material para la realización del estudio.

A la doctora Martha Dávila por seguir apoyando mi carrera, a todo el personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), especialmente al Dr. Ricardo Cerda, la Dra. Elva Cortes, la QCB. Leticia Guardado y a la gran ayuda del entusiasta MC. Miguel Elías Aguado, muchas gracias.

Al departamento de Anatomía Patológica del hospital de especialidades UMAE No. 25 a cargo del Dr. Eduardo Castelán Maldonado y especialmente a la Dra. Fabiola García, al Dr. Luis Menchaca, al Dr. Javier Pacheco y al Biol. René Reynaga.

A la clínica Medicina Diagnóstica, especialmente al Dr. Ángel Zavala Pompa así como a todo su personal.

Al laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, especialmente al Dr. Pablo Zapata Benavides por aceptarme en su laboratorio y fungir como el director de mi tesis, a todos mis compañeros; Diana Zamora, Marisol Blancas, Santiago Saavedra, Fernanda Thompson, Edgar Manilla, Karina Chávez, Yanais Garza, María José Gómez, Débora Garza y Emanuel Salazar.

A mi Comité de tesis conformado por la Dra. Diana Reséndez, el Dr. Moisés Franco y el Dr. Edgar Mendoza.

Al laboratorio de Micología que me acepto como hijo adoptivo, gracias a la Dra. Elva Arechiga, Eduardo Franco, Efrén Robledo, Carlos Aguirre, Gerardo Ramos, José Dávila, Raúl Aguirre, Patricio Zapata. A mis compañeras de maestría Diana Miranda, Elsa Garza, Ofelia Sánchez, Citlali Chacón, Michelle Zamudio y Samanta Flores.

A mis amigos los Ing; Ángel Colunga, Alonso Gonzales, Jesús Pedroza y Marco Gonzales, y a los QBP; Hugo Aldape, Ledy Becerra y Alfredo Rangel.

A Barbará Marín, su familia y a todas las personas que contribuyeron a lograr esta meta, muchas gracias.

Y por sobre todo a mi Familia, por su incondicional apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xi
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCION	3
3. HIPOTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo General	5
4.2. Objetivos Particulares	5
5. ANTECEDENTES	6
5.1 Anatomía de la Glándula Mamaria	6
5.2 Histología de la Glándula Mamaria	7
5.3 Patologías de la Glándula Mamaria	10
5.3.1 Enfermedades Benignas de la Mama	10
5.3.2 Cáncer de Mama	16

5.3.2.1. Epidemiología	16
5.3.2.2. Etiología	17
5.3.2.3. Tipos de Cáncer de Mama	18
5.3.2.4. Clasificación del Cáncer de Mama	19
5.3.2.5. Estadios del Cáncer de Mama	21
5.3.2.6. Tratamiento del Cáncer de Mama	24
5.3.2.7. Factores Pronósticos del Cáncer de Mama	25
5.3.2.8. Marcadores Moleculares	27
5.4. Proteína Par-4	30
5.4.1. Papel Proapoptótico de Par-4	32
5.4.2. Mecanismo de Apoptosis por Par-4	33
5.4.3. Antagonismo de Cáncer por Par-4	35
5.4.4. Regulación de la Función de Par-4	36
5.4.5. Apoptosis Selectiva de Células Cancerosas	39
5.4.6. Quimioprevención para la inducción de Par-4	40
6. MATERIALES Y METODOS	42
6.1. Grupo de Estudio	42
6.2. Criterios de Inclusión	43
6.3. Criterios de Exclusión	44
6.4. Inmunohistoquímica	45
6.5. Interpretación Inmunohistoquímica	47
6.6 Análisis Estadísticos	48
7. RESULTADOS	49
8. DISCUSIONES	57
9. CONCLUSIONES	61
10. LITERATURA CITADA	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.Descripción de casos con tejido histologicamente normal (Grupo I)	51
2.Descripción de casos con tejido mamario de lesiones benignas (Grupo II) . . .	52
3.Descripción de casos con cáncer de mama y supervivencia >5 años (Grupo III) .	53
4.Descripción de casos con cáncer de mama y supervivencia <5 años (Grupo IV) .	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía de la glándula mamaria	7
2. Ductos de una glándula mamaria en desarrollo	8
3. Ductos de la glándula mamaria en crecimiento en TEBs	10
4. Representación de la estructura de las células epiteliales en el seno	19
5. Estadios del cáncer de mama	23
6. Representación Esquemática de Par-4	31
1. Grafico de distribución de valores cuantitativos de la inmunohistoquímica	55
7. Inmunohistoquímica de Par-4 en tejido mamario	56

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
ACS	American Cancer Society
AHF	Antecedentes Heredo-Familiares de CM
AJCC	American Joint Committe on Cancer
Akt1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APP	Antecedentes Personales Patológicos de importancia para CM
Arg	Arginina
AT-3	Linea celular de Carcinoma Prostatico
ATRA	All-trans-retinoic acid
B16F10	Linea celular de Melanoma Murino
Bcl-2	Proteina (B-cell lymphoma 2)
Bcl-xL	Proteina (B-cell lymphoma-extra large)
B-DIM	3,3' diindolylmetano
Ca ²⁺	Calcio
CK	Citoqueratinas
CM	Cáncer de mama
Colo-357	Linea celular de cancer de colon
COX-2	Ciclooxigenasa 2
C-ter	Extremo carboxilo terminal
DAB	Diaminobencidina
DAXX	Death-Domain-Associated Protein 6
DISC	Death Inducing Señaling Complex
Dlk	DAP-like kinase
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ErbB-1	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal-1
ErbB-3	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal-3
ErbB-4	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal-4
ERE	Elemento de Respuesta a estrógenos
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FADD	Fas-associated dead domain
Fas	Receptor Fas también llamado Apo-1
FasL	Ligando de Fas

Fig	Figura
H&E	Tinción de Hematoxilina y Eosina
Her2/neu	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal-2
HRP	Horse Raddish Peroxidase
HT-29	Línea celular de adenocarcinoma de colon
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
IFN- α	Interferón alfa
IFN- γ	Interferón gamma
IGF-1	Factor de Crecimiento Similar a Insulina 1
IGF-2	Factor de Crecimiento Similar a Insulina 2
IGFR1	Receptor del Factor de Crecimiento Similar a Insulina 1
IKK β	Inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRS1	Insulin receptor substrate 1
I κ B	Inhibidores de NF- κ B
kDa	Kilo Daltones
Ki-67	Kiel 67 protein
L3.6pl	Línea celular de cáncer pancreático
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
MEC	Matriz extracelular
MEK	Extracellular signal-regulated <i>protein</i> kinase
min.	Minutos
mL	Microlitros
NES	Secuencia de exportación nuclear
NF- κ B	Factor Nuclear kappa B
NLS	Señal de Localización Nuclear
NLS	Secuencia de Localización nuclear
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
N-ter	Extremo amino terminal
°C	Grados Celsius
p 14-3-3	Proteína Chaperona 14-3-3
p53	Proteína p53
p62	Proteína p62
Par-4	Proteína (prostate apoptosis response 4)
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
PAWR	Gen de Par-4
PBS	Buffer de fosfato
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKC ζ	Proteína cinasa C Zeta

PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue Deleted from Chromosome-10
R.R	Riesgo Relativo
Ras	Proteína Ras
RE	Receptor de estrógenos
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
RP	Receptor de progesterona
S249	Serina 249
SAC	Selective Apoptosis of Cancer Cells
SSA	Secretaria de Salud
T155	Treonina 155
TBS	Tris Buffered Saline
TDLUs	Unidades terminales ductales lóbulo-alveolares
TEBs	Yemas del extremo terminal
TGF- α	Factor Transformante de Crecimiento alfa
THAP-1	THAP domain containing apoptosis associated protein 1
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRAIL	Tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducer ligand
TRS	Target Retrieval Solution
UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
UV	Luz Ultravioleta
VEGF	Factor de Crecimiento Epidermal Vascular
WAGR	Síndrome de tumor de Wilms-Aniridia-anomalías Genitourinarias -Retraso mental
WT-1	Proteína del Tumor de Wilms
XIAP	Proteína (X-linked inhibitor of apoptosis)
ZIPK	Zipper-interacting protein kinase
ZL	Zipper de Leucina

1. RESUMEN

La proteína proapoptótica Par-4 fue identificada por primera vez en células cancerosas que experimentaban apoptosis. De especial interés es el hecho de que en estas células su localización nuclear es suficiente para inducir apoptosis en ausencia de estímulos secundarios. Además, estudios recientes consideran a Par-4 como un supresor de tumor; ya que la pérdida de su expresión podría ser un evento clave durante la carcinogénesis debido a que existe una relación entre la baja expresión de Par-4 y el cáncer. Por tanto consideramos la posibilidad de que Par-4 pudiera encontrarse bajamente expresada en cáncer de mama ya que no ha sido reportada esta proteína en esta neoplasia, razón por la cual analizamos su expresión en muestras de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, de buen y mal pronóstico, lesiones benignas y tejido normal de mama, si había relación entre los niveles de expresión y su pronóstico.

Se analizó su expresión mediante inmunohistoquímica, evaluándola en forma semicuantitativa y cuantitativa (intensidad en programa de análisis de imagen). Ambas formas de medición fueron homogéneas ($P > 0.05$) y ambos métodos revelaron que no hubo una expresión significativa de Par-4 en las muestras de tejido sano de mama. Las lesiones benignas y neoplásicas mostraron una intensa expresión de la proteína, confinada en su mayoría a células epiteliales y su localización fue predominantemente nuclear en ambos tipos celulares siendo las células ductales las que mostraron mayor intensidad de expresión en comparación con las células mioepiteliales, con tinción de estroma no apreciable. El hallazgo más notable es que en el grupo de mal pronóstico hubo una disminución significativa ($P > 0.05$) en el nivel de expresión en comparación a los grupos de lesiones benignas y de mal pronóstico. En conclusión mostramos aquí por primera vez que la disminución en el nivel de expresión de Par-4 en cáncer de mama podría estar relacionado a un pronóstico desfavorable.

ABSTRACT

The proapoptotic protein Par-4 was discovered for the first time in cancer cells undergoing apoptosis. Interestingly nuclear localization of Par-4 is sufficient to induce apoptosis in cancer cells in absence of additional stimuli. Also, recent studies support the idea that Par-4 acts as a tumor suppressor indicating that its loss is a key event in carcinogenesis due to the relationship of its downregulation and cancer. Thus we considered that Par-4 could be downregulated in breast cancer because there aren't previous works of this protein in this disease, that's why we analyzed its expression on mammary tissue of healthy patients, patients diagnosed with benign lesions and with breast cancer of good and bad prognosis and if there exists a relationship with the levels of Par-4 and survival. Immunohistochemistry was used to determine Par-4 expression and was measured by quantitative and semiquantitative (Image analysis software) methods. Both methods show homogeneity ($P > 0.05$) and found no significant expression of Par-4 in normal breast tissue. Benign lesions and breast cancer tissue showed strongly nuclear expression of Par-4 predominantly in epithelial cells especially on ductal cells and a lower expression on myoepithelial cells with no appreciable stromal staining. The most exciting finding was that a significant ($P > 0.05$) reduction on the levels of Par-4 were detected on the group of patients with bad prognosis compared with those patients with benign lesions and the group of good prognosis. In conclusion we show for the first time that a reduction of the expression levels of Par-4 in breast cancer could be related to unfavorable prognosis.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama se ha convertido en la neoplasia que más frecuentemente afecta a las mujeres en el mundo, se estima que 1 de cada 8 mujeres la padecerá en el transcurso de su vida y que 1 de cada 28 mujeres morirá por esta enfermedad. En México hay Estados donde el cáncer de mama rebasó al cáncer cervicouterino como primera causa de muerte en mujeres.

Una vez establecido el diagnóstico de cáncer de mama, los factores pronósticos y predictivos ayudarán en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Se reconoce como factor pronóstico a cualquier parámetro que se asocie con una determinada supervivencia en ausencia de tratamiento adyuvante mientras que los predictivos suministran información referente a la respuesta a la terapia. Los factores pronósticos validados son pocos y no han aumentado en la última década. Se mantienen como tales el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el grado histológico y nuclear, la edad y los receptores de estrógeno y de progesterona. En cuanto a los factores predictivos validados sólo se consideran significativos los receptores hormonales y el Her-2/neu.

También se han mostrado alterados muchos otros oncogenes y genes supresores de tumor en el cáncer de mama, pero nada se sabe de la expresión de la proteína proapoptótica Par-4, proteína que es esencial para el mecanismo de apoptosis. Su sobreexpresión ectópica sensibiliza a las células a la apoptosis mediada por gran variedad de estímulos y agentes apoptóticos. De especial interés es el hecho de que la localización nuclear de Par-4 en células cancerosas es suficiente para inducir apoptosis en ausencia de estímulos secundarios. Además, estudios previos indican una relación entre la baja expresión de Par-4 y el cáncer, ya que se ha encontrado escasa o nula expresión en cáncer renal, pancreático, nasofaríngeo, endometrial, pulmonar, en neuroblastoma, leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide crónica; considerándose por esto a Par-4 como un supresor de tumor, ya que la pérdida de su expresión podría ser un evento clave durante la carcinogénesis. Este argumento es respaldado por estudios en ratones nulos de Par-4 que mostraron una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores espontáneos. Por tanto consideramos la posibilidad de que Par-4 pudiera encontrarse bajamente expresada en cáncer de mama y que este nivel de expresión se relaciona con un pronóstico desfavorable; convirtiendo a Par-4 en un biomarcador potencial, útil en la valoración pronóstica de los pacientes con cáncer de mama; por lo cual analizamos su expresión y localización celular en muestras de tejidos sanos y de tumores benignos y malignos de mama y si su nivel de expresión se asocio con el pronóstico de los pacientes.

3. HIPÓTESIS

El nivel de expresión de Par-4 en cáncer de mama se asocia al pronóstico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si el nivel de expresión de Par-4 en cáncer de mama se asocia con el pronóstico.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la expresión de Par-4 mediante inmunohistoquímica en tejido de mama embebido en parafina proveniente de biopsias correspondientes a tejido normal, tumores malignos y benignos.
2. Determinar los tipos celulares que expresaron Par-4 en tejido de mama y la localización subcelular de la proteína.
3. Evaluar mediante métodos semicuantitativos y cuantitativos el nivel de expresión de Par-4.
4. Determinar si el nivel de expresión se asocio al pronóstico de los pacientes con cáncer de mama.

5. ANTECEDENTES

5.1 Anatomía de la Glándula Mamaria

Los senos son órganos en forma de pera, cuyo tamaño varía ampliamente entre las mujeres, cada uno se sitúa sobre los músculos del pecho que cubren las costillas. Internamente se encuentran divididos en 15 a 20 secciones llamadas lóbulos, que a su vez contienen muchos lobulillos más pequeños. Los lobulillos contienen grupos de glándulas diminutas capaces de producir leche con el estímulo hormonal adecuado. La leche fluye de los lobulillos al pezón por unos tubos delgados llamados ductos lactíferos.

El pezón está en el centro de un área oscura de piel llamada la areola y cada pezón tiene de 6 a 9 salidas de los ductos, los cuales son independientes unos de otros. Los espacios entre los lobulillos y los conductos están llenos de tejido adiposo. Fig 1. El seno también tiene tejido conectivo; arterias, venas, nervios, ganglios y vasos linfáticos.

La mayoría de las venas pequeñas del seno drenan hacia la vena interna mamaria que es la más grande que recorre el seno. Algunas otras drenan hacia venas que se encuentran debajo de la axila o en las costillas. El sistema linfático en el seno drena a los

ganglios linfáticos que se encuentran en la axila, hacia los ganglios linfáticos internos de la mama, o hacia otros cercanos en las clavículas. (Spratt and Tobin, 1995)

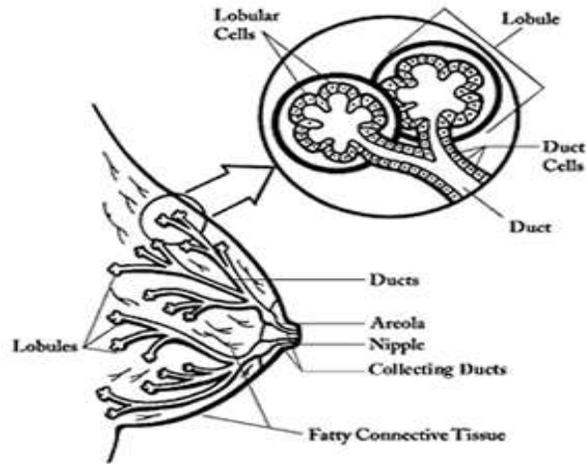


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria

5.2 Histología de la Glándula Mamaria

El epitelio de la glándula mamaria se deriva del ectodermo; la primera diferenciación deriva en su distinción frente a otros tejidos epiteliales, como la piel, folículos u otros tejidos derivados. Esta diferenciación ocurre en al menos dos etapas. La primera inicia a los 10 días de gestación, con el establecimiento de las bandas mamarias; dos líneas anchas derivadas del epitelio que recorren el eje antero-posterior, desplazadas simétricamente. Estas bandas representan la primera evidencia morfológica del patrón mamario formándose y diferenciándose. La segunda etapa ocurre cerca del día 11, con la delimitación de la región del pezón; el epitelio mamario forma un disco en forma de lente que comienza asociarse con el mesenquima mamario condensado y subyacente. El

epitelio mamario continua creciendo hasta formar una yema mamaria en forma de bulbo, la cual se alarga e invade el mesenquima condensado. La identidad celular del epitelio mamario se establece firmemente desde la etapa de yema del día 12.5 y se evidencia al ser posible el transplante de una presunta glándula mamaria al almohadón adiposo y regenera, por si mismo, las ramificaciones de los ductos. (Lewis, 2000)

En el ratón, la glándula mamaria aparece por primera vez en la etapa embrionaria a lo largo de la banda mamaria; una línea gruesa del ectodermo que se extiende desde el borde anterior hasta la yema posterior como un brote del epitelio que penetra el mesenquima desde la base para formar un sistema ductal ramificado rudimentario. Este rudimento permanece inactivo hasta la tercera semana de edad, cuando las hormonas de la pubertad estimulan los ductos a invadir y ramificarse en el almohadón adiposo. En esta etapa de desarrollo, es generalmente aceptado que la actividad de las células madre se encuentra en las yemas del extremo terminal (TEBs) Fig 2. (Williams and Daniel, 1983)

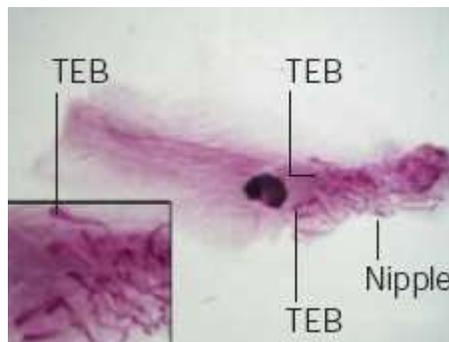


Figura 2. Ductos de una glándula mamaria en desarrollo de un ratón de 3 semanas donde se muestra que el crecimiento comienza del pezón hacia el ganglio linfático. Las yemas del extremo terminal (TEBs) forman el comienzo de los ductos en desarrollo. Tomada de Smalley and Ashworth, 2003

Estas estructuras forman las puntas en crecimiento de los ductos en extensión y consisten de una masa de “células body” que están rodeadas por una capa de “células cap”. Se cree que, dado que los ductos se alargan y las TEBs se mueven hacia delante, las células body dan origen a las células epiteliales lumbinales que forman la capa de interna de los ductos y las células cap dan origen a las células mioepiteliales que forman la capa de externa.

La apoptosis ocurre en el centro de la masa en desarrollo de las células body que dan origen a las células lumbinales para generar el lumen ductal. Las células cap también migran hacia la masa de células body y esto permite tener la idea de que las células cap son células madre. Las TEBs y los ductos adyacentes en crecimiento, se ramifican a través del almohadón adiposo hasta que llegan a los bordes. Los TEBs desaparecen y la se coloca en su ciclo normal adulto. (Srinivasan *et al.*, 2003)

El epitelio mamario maduro de la rata consiste de dos poblaciones celulares; las células lumbinales asociadas con células basales /mioepiteliales rodeadas de la membrana basal que separa al epitelio del estroma. Las células lumbinales son cuboidales o células en forma de columna que delinean los ductos y los alveolos y son responsables de la secreción de la leche. Los ductos primarios y secundarios, pueden estar compuestos de varias capas de células lumbinales epiteliales, y se van volviendo menos a medida que se incrementan las ramificaciones. La mayoría de los ductos terminales solo tienen una capa de células lumbinales. Fig 3. (Sekhri *et al.*, 1967)

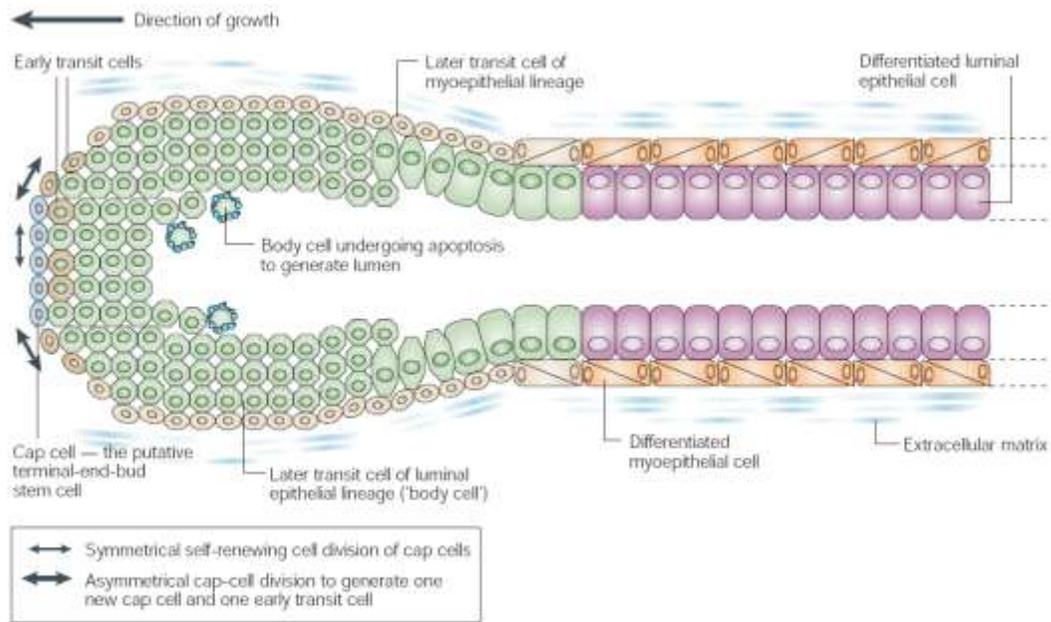


Figura 3. Ductos de la glándula mamaria en crecimiento en las yemas del extremo terminal (TEBs). Tomada de Smalley and Ashworth, 2003

La interacción de las células ductales lumbales y la matriz extracelular (MEC) es mediada por el mioepitelio, aunque algunas de las células lumbales en los ductos mamarios pueden alcanzar la membrana basal; las células alveolares mioepiteliales son en forma de estrella y forman una estructura en forma de cesta alrededor del acino, originando la exposición de la mayoría de la superficie basal de las células lumbales a la membrana basal.

Las células mioepiteliales son alargadas y se encuentran formando una monocapa bajo las células lumbales. Son altamente contráctiles y su ultraestructura es reminiscente a las de musculo liso, incluida la expresión de actina, miosina y endopeptidasa neutral.

El uso del término basal para referirse a esta población celular se tomo de un artículo de Moll y sus colegas en 1982, quienes describieron las citoqueratinas (CK) que expresaban. (Moll *et al.*, 1982)

Fue reconocible por mucho grupos que las citoqueratinas de alto peso molecular CK5 y CK14 identificadas son también expresadas en las células basales del epitelio estratificado y por ello se denominaron CK basales (las células luminales expresan CK y CK18, ausentes en basales). (Nagle *et al.*, 1986)

Las células mioepiteliales se encuentran separadas permanentemente del tejido conectivo por la membrana basal. Su capacidad para contraerse en respuesta a la hormona oxitocina juega un papel fundamental en la salida de leche durante la lactancia. Además la capacidad de estas células como supresoras de tumor han sido recientemente revisadas. (Smalley and Ashworth, 2003)

El compartimiento estromático está compuesto además de otros elementos celulares del mesenquima (adipositos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, y células nerviosas) y elementos acelulares de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno fibroso y no fibroso, proteoglicanos, etc.) que influyen el desarrollo de la glándula mamaria y la diferenciación en el desarrollo embrionario, el crecimiento ductal postnatal, la morfogénesis en la ramificación de los ductos y la carcinogénesis, además de proveer el soporte mecánico del tejido. (Kass *et al.*, 2007)

5.3 Patologías de la Glándula Mamaria

Las patologías de la mama se pueden clasificar en patologías benignas o malignas, estas últimas frecuentemente denominadas carcinomas, debido a su origen epitelial.

5.3.1 Enfermedades Benignas de la Mama

Las patologías benignas de la mama son las llamadas enfermedades fibroquísticas, displasias mamarias o mastopatías benignas, las cuales refieren a un rango de cambios en la mama, desde nodularidad clínica cíclica hasta la enfermedad proliferativa y no proliferativa benigna que se observa en una biopsia. Los tumores benignos son proliferaciones que presentan una morfología similar a la mama normal (no presentan atipias), con un aumento en el número de acinos glandulares mamarios (hiperplasia lobular) ó de las células epiteliales de los conductos (hiperplasia ductal) o ambos junto a una marcada fibrosis circundante (fibroadenoma) y no presentan diseminación a otras partes del cuerpo. (Renwick, 1976)

Las lesiones benignas comúnmente diagnosticadas incluyen mastopatía fibroquística, fibroadenomas, ectasia ductal, papilomatosis, adenosis, metaplasia apocrina, quistes con microcalcificaciones, hiperplasias ductales, e inflamación. (Fitzgibbons *et al.*, 1998)

La mastopatía fibroquística es la enfermedad benigna más frecuente de la glándula mamaria, el 50% de las mujeres en edad reproductiva la tienen en forma clínica

y en el 90% hay cambios histopatológicos. Se manifiesta con dolor en los pechos generalmente antes de la menstruación. El diagnóstico es fundamentalmente clínico, auxiliado de ser necesario por los métodos paraclínicos como mastografía, ultrasonido, aspiración de los quistes, etc. El tratamiento de la mastopatía fibroquística está encaminado a frenar el efecto estrogénico, la progresión de los fenómenos proliferativos y revertir los cambios.

El fibroadenoma es un tumor benigno que ocupa el tercer lugar dentro de la patología mamaria solamente superado por la mastopatía fibroquística y el carcinoma. Haagensen da una relación de un fibroadenoma por cada 4 carcinomas. Su origen se relaciona con la estimulación estrogénica de los tejidos mamaros. Responde al intenso estímulo de crecimiento al que está expuesta la mama durante el embarazo. Es un tumor pequeño, indoloro, que generalmente se descubre en forma accidental. No es raro que sean tumores múltiples y bilaterales. Durante el embarazo y la lactancia puede sufrir infarto espontáneo y necrosis. Clínicamente son tumores bien delimitados, redondos o lobulados de consistencia elástica o de caucho, pétreo en la anciana (calcificaciones), móvil (esta es una de sus características más distintivas) y la edad de la paciente es importante para el diagnóstico. Mastográficamente la imagen de un quiste y la de un fibroadenoma son similares. El ultrasonido mamario ayudará en el diagnóstico diferencial. El tratamiento es la escisión.

El papiloma intraductal es un tumor que encuentra dentro de los conductos mamaros y está formado por células que provienen del revestimiento de un conducto terminal de la mama; suele ser solitario y de crecimiento lento, se manifiesta por

descarga serosa o sanguinolenta por el pezón, espontánea y unilateral. El diagnóstico diferencial se hace con un cáncer de mama, ectasia ductal o mastopatía fibroquística. Ante la sospecha clínica de un papiloma se hace citología de la descarga. El tratamiento es la extirpación del conducto afectado.

La Ectasia ductal se refiere al bloqueo o taponamiento de un conducto mamario, afecta cerca de una de cada cuatro mujeres cercanas a la edad de la menopausia. Puede ser asintomática o producir dolor en los pechos y presentarse con secreción por el pezón: que suele ser sucia, de color oscura aunque estas características también se pueden dar en el cáncer. El tratamiento después de descartar que no se tenga cáncer puede ser médico o en algunos casos se realiza una cirugía pequeña para retirar los conductos mamarios.

El Tumor Filodes se consideraba un tumor maligno, tiene poca frecuencia, se presenta como un tumor duro, móvil, voluminoso, de rápido crecimiento con protrusión de la piel, la cual es brillante y adelgazada llegando a observarse incluso una red venosa superficial. A la palpación son generalmente de tamaño grande, que pueden llegar a ocupar la totalidad del volumen mamario, de consistencia dura elástica, alternando con áreas renitentes, las cuales corresponden a zonas quísticas o zonas de hemorragia o necrosis. Cuando es pequeño no puede distinguirse clínicamente de un fibroadenoma. Se recomienda la extirpación completa del tumor, incluyendo áreas de tejido sano alrededor del mismo, previa confirmación histopatológica transoperatoria de benignidad.

La adenosis esclerosante es una afección benigna en la que se encuentra un tejido similar a una cicatriz en una glándula, puede ser necesaria una biopsia para determinar la diferencia entre tejido normal o canceroso (Ernester, 1981)

Los diagnósticos histológicos de biopsias de mama de lesiones benignas son comunes y han sido asociados con el futuro desarrollo de cáncer de mama (CM). (Dupont and Page, 1985; London *et al.*, 1992) El Comité de Cáncer del Colegio Americano de Patólogos en 1998, clasifico al carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobulillar *in situ* y la hiperplasia atípica como factores moderados de incremento en el riesgo del desarrollo de futuras neoplasias, mientras que el resto de las lesiones fue clasificado como de bajo o nulo riesgo. (Hutter, 1986; Fitzgibbons *et al.*, 1998)

Sin embargo, trabajos subsiguientes reportaron un incremento significativo en estas categorías de bajo riesgo. (Wang *et al.*, 2004) Posteriormente Hartmann y cols. reportaron hallazgos que sugerían un riesgo incrementado persistente por al menos 25 años de las mujeres diagnosticadas previamente con enfermedad benigna, en contraste con los hallazgos previos, (Dupond and Page, 1989; Krieger and Hiatt, 1992) aunque no se encontró riesgo incrementado específicamente en mujeres sin antecedente familiar y hallazgos no proliferativos. (Hartmann *et al.*, 2005)

En 2007 Ashbeck y cols. contribuyeron a incrementar la evidencia del riesgo de desarrollar CM seguido de biopsia por una lesión benigna, incluyendo algunos diagnósticos histológicos en ausencia de atipia. La hiperplasia atípica, la atipia citológica y el carcinoma lobulillar *in situ* fueron asociados con un incremento elevado al riesgo de desarrollo de CM consistente con la literatura existente. En cuanto a los grupos de bajo

riesgo, mostraron una asociación estadísticamente significativa al subsecuente desarrollo de CM de casi el doble del riesgo experimentado por mujeres evaluadas mediante mamograma. Las categorías que mostraron la asociación más alta incluyen la adenosis, la metaplasia apocrina, calcificaciones y la hiperplasia ductal. Los fibroadenomas, la inflamación y los quistes no mostraron asociación. (Ashbeck *et al.*, 2007)

5.3.2 Cáncer de Mama

5.3.2.1 Epidemiología

El CM es el tumor maligno más frecuente en mujeres en el mundo. Representa el 19% del total de cánceres diagnosticados en la mujer. (Ferlay *et al.*, 2002)

La frecuencia de CM en México es mayor en los estados del norte y centro del país, donde el nivel socioeconómico y cultural de las mujeres es más elevado. Esto ubica al estado de Nuevo León en segundo lugar después del Distrito Federal en cuanto a mortalidad por CM. (Bigbee and Herberman, 2003) En México hay estados donde el CM rebasa al carcinoma cervicouterino como primera causa de muerte en mujeres (Rodríguez *et al.*, 1999). Además es notorio el aumento en todo el mundo en la frecuencia del CM y este aumento es mayor en países desarrollados.

En México, el cáncer afecta más frecuentemente a las mujeres (62.5% comparado con 37.5% de los hombres). En el 2001 se informaron 102,657 casos de cáncer en el Registro Histopatológico de Neoplasias malignas, SSA. El CM represento 11,242 casos y ocupó el segundo lugar de los cánceres en la mujer, con 17% del total. La

tasa de mortalidad por cáncer de mama se elevó en México a 13.6 por cada 100,000 mujeres entre 45 y 64 años y la secretaria de Salud calcula un promedio de 21 años de vida productiva perdidos por cada mujer. (Bigbee and Herberman, 2003)

5.3.2.2. Etiología

La etiología del cáncer de mama no es conocida, en numerosos estudios se investigan los posibles factores para predecir y cuantificar el riesgo de padecer la enfermedad, aunque en más del 80% de mujeres, éste aparece de manera esporádica sin factores de riesgo que lo expliquen. Entre los factores de riesgo más importantes y que tienen un riesgo relativo (R.R) mayor a 4 se encuentran el ser mujer, la edad, mutaciones genéticas, tener más de un pariente de primer grado con CM, historia personal de CM, densidad alta de la mama y diagnóstico de hiperplasia atípica por biopsia.

Entre los factores de riesgo con RR de 2.1 a 4.0 se encuentran tener solo un pariente en primer grado con CM, haber recibido dosis altas de radiación en el pecho y alta densidad de huesos en la menopausia. En cuanto a los factores relacionados a las hormonas circulantes y con una R.R de 1.1 a 2.0 se encuentra la edad del primer embarazo a término, la menarquía temprana, la menopausia tardía, el ser nulípara, no haber amamantado, el uso reciente de anticonceptivos o el uso prolongado de terapia de reemplazo hormonal, y la obesidad post-menopáusica. En este rango de RR pero también entran factores como el antecedente personal de cáncer de endometrio, de ovario ó de colon, el consumo de alcohol, tabaco, la estatura alta, el estatus socioeconómico alto y la herencia judía. (Hulka and Moorman, 2001)

5.3.2.3. Tipos de Cáncer de mama

El CM humano es muy heterogéneo en su morfología, respuesta a la terapia y al curso clínico. Esta heterogeneidad se puede originar de las diferencias de las poblaciones celulares y/o puede ser resultado de diferentes combinaciones de la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores de tumor. Tradicionalmente los patólogos se refieren a solo dos grupos de cáncer de mama; carcinomas ductales invasivos y lobulillares invasivos, sin embargo se demostró claramente que la mayoría de los tumores no provienen del sistema ductal, sino de las unidades terminales ductales lóbulo-alveolares (TDLUs) Fig 4; que son las estructuras en el seno humano equivalentes a los alveolos secretores murinos, pero más complejas, ya que poseen un grado de organización superior y están formados por alveolos agrupados alrededor de un ducto distinto y de ramificaciones ductales laterales, además también poseen un estroma diferente, formado por fibroblastos intralobulares, contrario a los fibroblastos interlobulares del resto del tejido conectivo del seno. (Wellings, 1980)

Es generalmente aceptado que los CM son de origen clonal, pero el hecho de que sean originados de una sola célula parece difícil de probar ya que se sabe que toda la subunidad TDLU es clonal. (Diallo *et al.*, 2001)

Aun así, la evidencia actual apoya que la mayoría de los CM tienen fenotipo de célula luminal ya que tiene la capacidad para secretar mucinas a la superficie luminal y tienen ultraestructura de célula secretoria y conforman más del 90% de los CM humanos. (Streuli and Haslam, 1998)

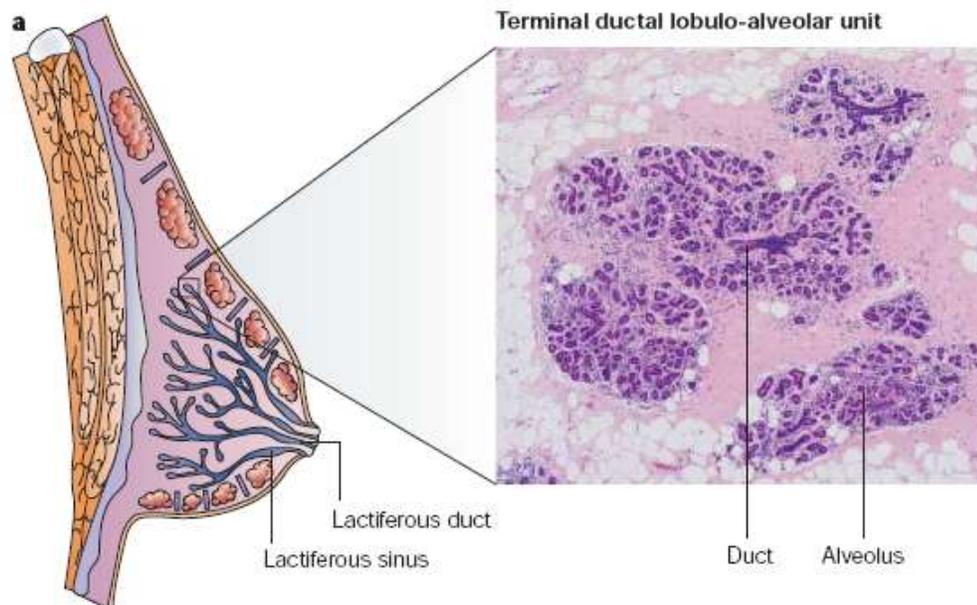


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las células epiteliales en el seno humano y una microfotografía de H&E del las unidades terminales ductales lóbulo-alveolares (TDLUs). Tomada de Smalley and Ashworth, 2003

5.3.2.4. Clasificación del Cáncer de Mama

El CM se clasifica de acuerdo a su grado de invasión en; carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo, y de acuerdo a su origen celular en ductal o lobulillar.

Carcinoma *in situ*

Esta forma de cáncer es localizado y no representa un estadio invasor. Existen tres subtipos principales de carcinoma *in situ* en base a su origen celular: carcinoma

intracanalicular, carcinoma lobulillar *in situ* y carcinoma papilar intracanalicular. Estos se originan en la unidad lobulillocanalicular terminal.

Carcinoma invasor

Este crece en todas direcciones por lo que se puede infiltrar y fijarse a la fascia profunda de la pared torácica, la piel sufre retracción al igual que el pezón. Hay invasión de los vasos linfáticos y ganglios provocando edema, engrosamiento y dolor con eritema.

Dentro de este grupo existen cuatro subtipos:

Carcinoma lobulillar infiltrante

Comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectarlo a través de una mamografía.

Carcinoma ductal infiltrante

Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.

Carcinoma de paget

Es un tipo de carcinoma ductal, que crece en los ductos excretores principales y compromete la piel del pezón y aureola donde provoca cambios edematosos.

Carcinoma medular

Es un tipo de carcinoma ductal poco frecuente, no llega al 1%. Es un tumor grande, bien delimitado, blando y se considera de mejor pronóstico que el ductal común.

5.3.2.5. Estadios del Cáncer de Mama

El sistema TNM consiste en la evaluación meticulosa del tumor primario, fue creado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) para la estadificación de los tumores, logrando así estandarizar la información acerca de que tanto se ha diseminado un tumor. Es el sistema más usado para describir los estadios del CM.

La estadificación del CM puede ser basada en los resultados de un examen físico, biopsia y exámenes de imagen, (llamado estadio clínico) o en los resultados de estos más los resultados de la cirugía (llamado estadificación patológica). La estadificación descrita aquí es la patológica, que incluye los hallazgos encontrados después de la cirugía, cuando el patólogo analiza los tejidos de la mama y los ganglios linfáticos cercanos. Este tipo de estadificación es más precisa que la estadificación clínica, ya que permite ver al médico de primera mano la extensión del cáncer.

El sistema de estadificación TNM clasifica al cáncer basado en los estadios T, N y M; la letra T estadifica el tamaño del tumor y que tanto se ha diseminado entre el seno y a los órganos cercanos, la N se refiere a la diseminación a ganglios linfáticos y la M es para la metástasis que se refiere a su dispersión a órganos distantes.

Una vez que las categorías del TNM se han determinado, esta información es combinada en un proceso que se denomina agrupamiento de estadios. Los cánceres con estadios similares tendrán una perspectiva similar y serán tratados de manera similar. El estadio se escribe en números romanos del estadio I (el menos avanzado) al IV (el más avanzado) Fig 4. Y el cáncer no invasivo es llamado estadio 0. La etapa del cáncer es

uno de los factores más importantes en la selección de las opciones de tratamiento y el más significativo en la predicción del pronóstico.

Estadio 0 - cáncer de mama no invasivo o *in situ*:

Carcinoma ductal *in situ*: Las células cancerosas están localizadas dentro de un ducto y no han invadido el tejido adiposo circundante de la mama.

Carcinoma lobulillar *in situ*: Las células anormales crecen dentro de los lobulillos, pero no atraviesan las paredes de los mismos.

Estadio I: El diámetro del tumor es 2 centímetros o menos y no se ha propagado a los ganglios linfáticos de la axila.

Estadio II: El tumor mide más de 2 centímetros pero no más de 5 centímetros, se ha propagado a los ganglios linfáticos debajo del brazo en el mismo lado en el que se encontró el cáncer, o ambos. Los ganglios linfáticos no están adheridos entre sí a los tejidos circundantes.

Estadio III: Se divide las IIIA y IIIB.

Estadio IIIA: El o los tumores miden más de 5 centímetros de diámetro, se han propagado a los ganglios linfáticos (que están adheridos entre sí o al tejido circundante) o ambas situaciones están presentes.

Estadio IIIB: En esta etapa se incluye el cáncer de mama de cualquier tamaño que se ha propagado a la piel, a la pared del tórax o a los ganglios linfáticos mamarios internos (ubicados debajo de las mamas y dentro del tórax)

Estadio IV: Independientemente de su tamaño, se ha propagado a lugares distantes, como huesos o pulmones, o a los ganglios linfáticos alejados de la mama (ACS, 2007-2008).

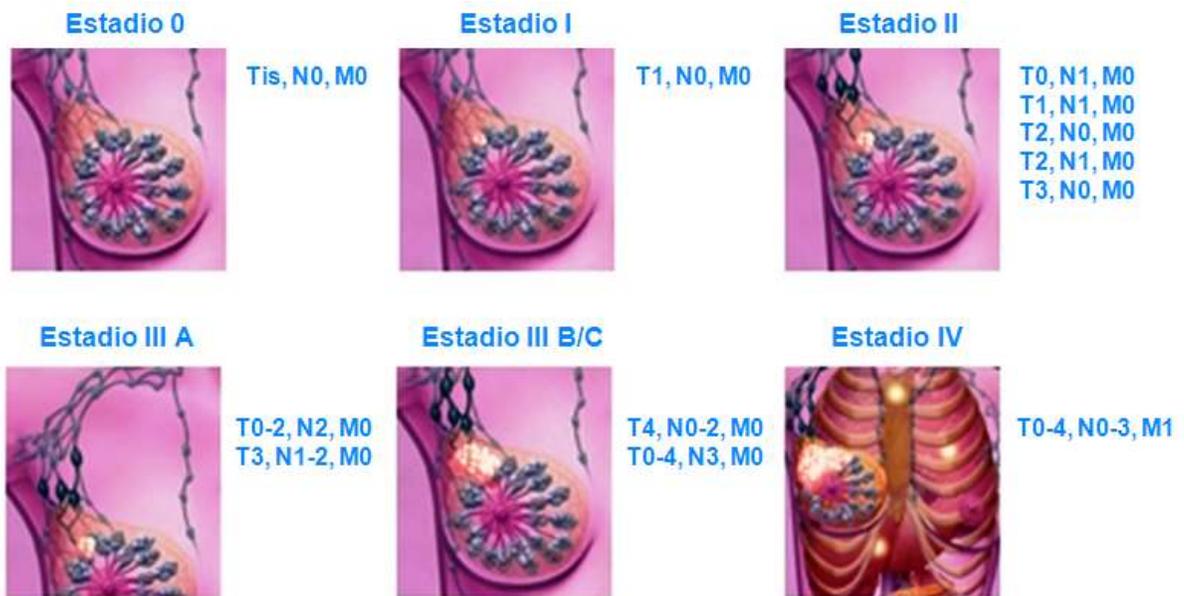


Figura 5. Estadios del cáncer de mama

5.3.2.6. Tratamiento del Cáncer de Mama

El tratamiento del CM depende del tamaño, ubicación, estadio, grado, estado hormonal y de la presencia de mutaciones en el tumor, si este se ha diseminado o no, además dependerá del estado general de salud del paciente, su edad y su estado de menopausia. (Hortobagy *et al.*, 1998)

La cirugía permanece como tratamiento de primera línea en el cáncer temprano, aproximadamente el 40% de los pacientes serán curadas pero no hay manera de predecir si tendrán o no una recaída. (Murphy, 1998)

La radioterapia en CM está claramente definida como posterior a la cirugía, después de esta, otras modalidades terapéuticas como quimioterapia y terapia endocrina pueden ser recomendadas como adyuvantes. (Rubioa *et al.*, 1998)

La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos que evitan la proliferación de células cancerosas mediante la eliminación de las células o evitando su multiplicación. Entre las principales familias de quimioterapéuticos empleados en el CM se incluyen alquilantes como la ciclofosfamida (C), los antimetabolitos como el 5-fluoracilo (F), metotrexato (M), antibióticos como la doxorubicina (A), epirubicina (E) y los inhibidores de la mitosis como el paclitaxel (P). (Salmòn *et al.*, 2006) Los esquemas más comunes de tratamiento son; CMF, CAF, AC, ACP, A seguida de CMF ó CEF. (Goldhirsh *et al.*, 2005)

Desde 1896 cuando Sir George Beatson demostró que la ovariectomía induce regresión de los tumores mamarios en las mujeres, el objetivo de la terapia endocrina en el CM ha sido depletar el cuerpo de estrógenos. A diferencia de la quimioterapia, la terapia endocrina no es toxica y por ello es mejor opción y se tolera mejor por las

pacientes. Es administrada a pacientes con receptores hormonales positivos para estrógeno o progesterona o bien que tenga positivos uno de los dos.

La secuencia preferida de tratamiento en pacientes premenopáusicas es un agonista de los estrógenos como el tamoxifeno seguido de un inhibidor de aromatasas como el letrozol, anastrozol o el exemestano y luego una progestina combinándolos con un análogo de hormona liberadora de gonadotropina como el leuprolide o el goserelin. (Murphy, 1998) En pacientes post-menopáusicas el tamoxifeno continúa siendo el fármaco de primera elección pero se ha encontrado asociado con un incremento en la detección de cáncer de endometrio. (Slamon *et al.*, 2006)

La terapia biológica se refiere al uso de anticuerpos monoclonales actúan contra las proteínas que están presentes en cantidades inusualmente grandes en las células tumorales, ejemplo de ellos el Trastuzumab aprobado para el tratamiento de CM en tumores que sobreexpresan HER-2/neu y el Bevacizumab que actúa bloqueando el VEGF y por tanto la angiogénesis. (Dowsett, 2001)

5.3.2.7. Factores Pronósticos del Cáncer de Mama

Una vez establecido el diagnóstico de CM, los factores pronóstico y predictivos ayudarán a la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Un biomarcador pronóstico implica una asociación con un intervalo libre de enfermedad o con una supervivencia media en ausencia de un manejo sistémico, en tanto que uno

predictivo conlleva una asociación con respuesta o falta de respuesta a un tratamiento en particular. (Bonadonna, 1999)

Dentro de los factores pronósticos bien respaldados en la literatura se encuentran: el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, tipo tumoral, la edad y los receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP). Los factores predictivos validados son menos; sólo se consideran significativos los RE y RP. Con estudios adicionales y la estandarización de los métodos de laboratorio, el Her-2/neu podría añadirse pronto a los factores pronósticos y predictivos validados. (Domínguez *et al.*, 2001)

El número de ganglios axilares positivos se asocia con supervivencia, recidiva, velocidad de la misma y fracaso del tratamiento. Sin evidencia de metástasis ganglionares la supervivencia a los 5 años es del 87%, con 1 es de 75%, con 1-3 es de 64.5% y con 4 ó más de solo el 34%.

El tamaño tumoral es el diámetro del tumor medido en dos dimensiones tomando en cuenta la mayor y se relaciona directamente con la posibilidad de metástasis ganglionares axilares. Así un tumor de 1cm o menor tiene el 26% de posibilidad de desarrollar metástasis y uno de más de 10 cm tiene hasta el 78% de desarrollar metástasis.

En cuanto al tipo tumoral; los medulares, tubulares, mucinoso y adenoide se asocian a buen pronóstico mientras que los poco diferenciados como el anillo de sello, carcinoma inflamatorio y los carcinosarcomas son más agresivos, así por ejemplo el tipo inflamatorio tiene solo un 11% de supervivencia a 5 años.

Dentro de las características del paciente significativas la edad es la única validada, las mujeres de menos de 35 años de edad tienen más probabilidad de que a su enfermedad se le asocien factores pronósticos negativos. (Hurtado *et al.*, 2004)

5.3.2.8. Marcadores Moleculares

Además de los factores pronósticos clásicos en el CM algunos marcadores moleculares han sido asociados a determinados pronósticos y se revisan de manera rutinaria en la práctica clínica. (Ross *et al.*, 2003) Entre los marcadores moleculares pronósticos de CM analizados mediante inmunohistoquímica se encuentran Ki 67, p53, la sobreexpresión del RE, RP y de Her-2/neu. Además de estos existen muchos otros de los cuales se han publicado resultados positivos, haciéndolos prometedores para el futuro, sin embargo están lejos de ser de utilidad clínica en la actualidad y su validación requiere estudios adicionales. (Beenken and Bland, 2002)

Receptor de Estrógeno

El RE es el marcador molecular que se determina comúnmente en los centros de salud, clasificando a los carcinomas mamarios en RE-positivos y RE negativos. Los estrógenos controlan la proliferación celular en el epitelio mamario normal y transformado, modulando la expresión de genes involucrados en la respuesta hormonal. (Altuci *et al.*, 1996) El RE regula la expresión de genes involucrados con la proliferación y muerte celular, tales como myc, VEGF, Bcl-2, IGFR1, IRS1, TGF α y

ciclina D1. (Osborne and Schiff, 2005) RE se encuentra expresado en un 70-80% de los tumores mamarios. Los pacientes con tumores RE positivos presentan una respuesta superior al 50% a la terapia endocrina. (Altuci *et al.*, 1996)

Receptor de Progesterona

El 45% al 60% de los cánceres de mama primarios y metastásicos expresan RP. La presencia de RE y RP aumenta la probabilidad de respuesta a los tratamientos hormonales. Entre el 55% y el 80% en pacientes con RE positivo carecen de la expresión de RP y se asocia con un peor pronóstico. Hoy día los RE y RP son considerados como indicadores pronósticos independientes e indispensables. (Huan *et al.*, 1997)

Her-2/neu

El gen c-erb-B-2 (Her-2/neu) es un proto-oncogén que codifica una proteína transmembranal de 185 kDa, homologa al receptor proteico del factor de crecimiento epidérmico, el cual posee actividad intrínseca de tirosina cinasa. (Shin *et al.*, 1981; Slamon *et al.*, 1989) Her-2/neu se suele activar por amplificación génica, los tumores que poseen esta amplificación también tienen un incremento en los niveles de la proteína c-erb-B-2 y por lo tanto una mayor estimulación celular. (Resse *et al.*, 1997) La amplificación del gen Her-2/neu o su alta expresión son evidentes en un 20 a 30% en CM primarios y es correlacionado con el incremento en la tumorigenicidad, invasión tumoral e incremento del potencial metastático, además de la inducción de la resistencia al cisplatino (Pietras *et al.*, 1994), ATRA (Siwak *et al.*, 2003), doxorubicina, taxol

(Baselga *et al.*, 1998) y al TNF e inclusive a radiaciones iónizantes (Liang *et al.*, 1989), dando con ello un pronóstico desfavorable. (Swiatoniowski *et al.*, 2003) Her2/neu es capaz de activar por vía Akt la producción de COX2 y disminuir el efecto apoptótico mediante la producción de óxido nítrico. (Simeone *et al.*, 2004)

Proteína p53

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17 y se considera un regulador negativo del crecimiento celular. Sus mutaciones constituyen la alternativa genética más frecuente en neoplasias malignas y se considera un factor de mal pronóstico porque determina la pérdida de la función supresora, activación del crecimiento celular y aumento del riesgo de progresión de la neoplasia. En CM, se observa mutado e inactivado, además de que la proteína mutada se encuentra acumulada debido a que es sumamente estable y actúa como reguladora negativa de la p53 tipo silvestre. Esta proteína se observa mutada en el 30% de los CM y dicta mal pronóstico pues se asocia a un fenotipo más agresivo y recaída del cáncer. (Elledge and Allred, 1994)

Antígeno Ki 67

El antígeno nuclear Ki67 identifica las células proliferantes dentro de un tumor, por tanto cuanto mayor es su tamaño, más agresivo es el tumor. La positividad mayor o igual a 20% se asocia con un mal pronóstico, Ki67 se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos y se relaciona de forma inversa a la presencia de receptores hormonales. (Clark and McGuire, 1999)

5.4. Proteína Par-4

Par-4 fue clonada por primera vez en células cancerosas prostáticas de rata independientes de andrógenos (AT-3) inducidas a apoptosis con Ionomicina. Mediante la técnica de hibridación diferencial se identificó a Par-4 como un miembro de un nuevo conjunto de genes que son transcritos en respuesta a la elevación del calcio. También se ha observado la inducción de su expresión durante la involución de la próstata ventral de rata después de la castración y esta inducción fue inhibida con el pretratamiento con nifedepino (Sells *et al.*, 1994) y con el tratamiento con testosterona.

Par-4 también ha sido inducida en modelos de cultivo celular solamente por señales apoptóticas y no por necrosis, arresto del crecimiento o estimulación de suero. Esta es conservada en vertebrados y su expresión es ubicua en tejidos de ectodermo, mesodermo y endodermo. Sin embargo está ausente en tipos específicos celulares como linfocitos, algunos tejidos de músculo liso, las células diferenciadas de los ductos de la próstata, las células epiteliales de la glándula mamaria y las células terminales diferenciadas de la retina, indicando con esto que durante la diferenciación se pierde su expresión. (Boghaert *et al.*, 1997)

Aunado al hecho de que Par-4 es una proteína proapoptótica, su expresión se incrementa durante el desarrollo, en las células que están muriendo, como las células de la membrana interdigitante del embrión de ratón y en la involución de la cola del renacuajo. Par-4 también desempeña un papel en el desarrollo neuronal, y un incremento en sus niveles de expresión causa apoptosis y sirve al mantenimiento de un número de neuronas en el sistema nervioso central. (El-Guendy and Rangnekar, 2003)}

El gen de Par-4 (PAWR) ha sido mapeado en el cromosoma humano 12q21, (Johnstone *et al.*, 1998) produce una proteína de 38 kDa formada por 322 aminoácidos (aa). Cuenta con una variedad de dominios estructurales que aluden a su mecanismo de acción. Par-4 tiene un dominio de zipper de leucina (ZL) de 42 residuos en su extremo carboxilo terminal (C-ter), junto con una secuencia de exportación nuclear (NES). En el extremo amino terminal (N-ter) tiene dos secuencias de localización nuclear (NLS), las cuales están altamente conservadas entre especies. Además posee un número de sitios consensos conservados para la fosforilación por parte de cinasas como PKA y PKC y un sitio para la fosforilación de Akt1. (Goswami *et al.*, 2005) La presencia de estos motivos en la proteína sugiere que la función de Par-4 pudiera estar regulada por modificación postraduccional, localización celular y dimerización con otras proteínas. Fig 6. (Ranganathan and Rangnekar, 2005)

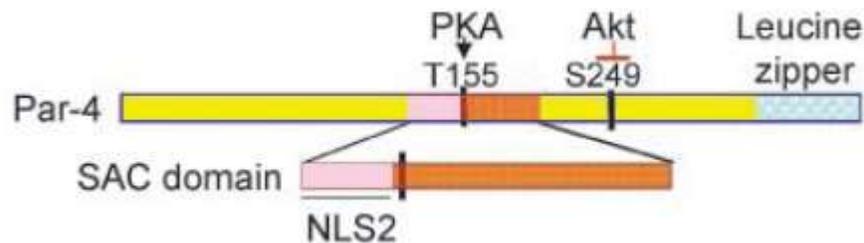


Figura 6. Representación esquemática de varios dominios de Par-4 (aa 1-332) y su dominio SAC (aa 137-95). Se muestran el sitio de fosforilación por PKA y la señal de localización nuclear (NLS), entre el dominio SAC. El sitio de fosforilación por Akt está localizado fuera del dominio SAC. Tomada de Zhao *et al* 2007.

5.4.1. Papel Proapoptótico de Par-4

Esto ha sido bien estudiado en modelos de cultivo celular, los estudios de sobreexpresión han revelado que un incremento en la actividad o en el nivel de Par-4 en células normales o inmortalizadas produce una disminución en el umbral a los estímulos de muerte celular, por ejemplo a la falta de factores de crecimiento, elevación de Ca^{2+} intracelular, radiación UV y gamma, TNF- α , IFN- γ , IFN- α y rayos X. Además Par-4 desempeña un papel esencial en la apoptosis iniciada por agentes como TRAIL, Vincristina, Doxorubicina y radiación.

En células transformadas, Par-4 es capaz de iniciar la muerte celular en ausencia de estímulos secundarios, interesantemente las células oncogénicas son más susceptibles a la apoptosis inducida por Par-4. Esta habilidad de ejecutar apoptosis solo en células cancerosas lo hace un arma potencialmente terapéutica. (Ranganathan and Rangnekar, 2005)

Bajo condiciones específicas la expresión endógena de Par-4 es por sí misma un agente apoptótico poderoso. Par-4 también desempeña un papel fundamental en la apoptosis neuronal y sirve para prevenir la hiperproliferación del tejido nervioso, (El-Guendy and Rangnekar, 2003) esto es logrado mediante la distribución asimétrica de la proteína Par-4 durante la mitosis de los progenitores neuronales; las células hijas que carecen de Par-4 se diferencian a neuronas, mientras que aquellas con altos niveles de Par-4 se dirigen a apoptosis. (Bieberich *et al.*, 2003)

Esta función de Par-4 puede ser explotada durante los trasplantes neuronales para inducir apoptosis selectiva de células pluripotenciales y enriquecer de precursores neuronales la población de células madre de embrionarias. (Bieberich *et al.*, 2004)

Par-4 también se ha visto involucrada en el desarrollo de desordenes neurodegenerativos, varios hallazgos señalan que incrementa la apoptosis en neuronas sanas. El primero es que se han encontrado niveles elevados de la proteína y su mensajero en neuronas apoptóticas de pacientes, modelos animales y cultivos celulares de enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Corea de Huntington, Esclerosis amiotrófica lateral, daño isquémico en cerebro y accidente cerebrovascular. (El-Guendy and Rangnekar, 2003; Mattson *et al.*, 1999) Segundo, se cree que facilita el desarrollo de estas condiciones degenerativas al inhibir la toma de colina en la sinapsis colinérgica. (Xie and Guo, 2004) Finalmente, también se ha reportado que Par-4 regula a la proteasa que escinde el precursor de la proteína beta para generar el péptido A β , la proteína patogénica clave del Alzheimer. (Xie and Guo, 2005)

5.4.2. Mecanismo de Apoptosis por Par-4

Par-4 pone en marcha el programa de muerte celular actuando a 2 niveles; el primero mediante la activación de los componentes moleculares de la maquinaria de la muerte celular y el segundo a través de la inhibición de los factores de supervivencia.

A la fecha Par-4 parece actuar mediante la vía extrínseca permitiendo el tráfico de Fas y su ligando a través de la membrana plasmática. Fas (CD95) al ser activado se

trimeriza y forma un complejo con la proteína adaptadora FADD (Fas-associated dead domain) y con la pro-Caspasa 8. Este complejo es llamado DISC (death-inducing signaling complex). La formación del DISC permite la escisión y activación del zimogeno pro-caspasa 8 a su forma activa. Par-4 transloca Fas y FasL a la membrana plasmática en el cáncer independiente de andrógenos, en donde la sobreexpresión de Par-4 permite directamente la muerte, sin embargo, el mismo efecto no es observado en las células cancerígenas dependientes de andrógenos donde Par-4 solo las sensibiliza. (Chakraborty *et al.*, 2001)

Par-4 también desempeña un papel muy importante como antagonista de factores de supervivencia y antiapoptóticos. Se ha visto que incrementa la actividad de caspasa 3 y la escisión de PARP en líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo que fueron inducidas a apoptosis y, su sobreexpresión en células malignas de LLA causa además de lo anterior una reducción en los niveles de expresión de Bcl-2. (Boehrer *et al.*, 2001)

Uno de los factores anti-apoptóticos más importantes en la célula es el factor de transcripción NF- κ B; un heterodímero que consiste de las subunidades p65 (RelA) y p50. Este dímero se encuentra unido a la proteína inhibitoria I κ B por lo que permanece inactivo en el citoplasma, pero con las señales apropiadas es fosforilado por IKK β , permitiendo la liberación de NF- κ B y es translocado al núcleo donde se une al promotor de genes blanco y regula la transcripción. Uno de ellos es XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) que impide la activación de las caspasas efectoras y las que están cascada arriba. (Baldwin, 1996; Barkett and Gilmore 1999) Par-4 inhibe NF- κ B en el núcleo impidiendo su fosforilación por IKK β o PKC γ que de otra manera le conferiría la máxima actividad a NF- κ B. Además, interfiere la fosforilación de IKK β al complejo I κ B

en el citoplasma, evitando también con esto la activación de NF- κ B. (Diaz-Meco *et al.*, 1999) Esta habilidad de inhibir factores de supervivencia podría ser esencial para su función en la sensibilización de apoptosis. (Ranganathan and Rangnekar, 2005)

5.4.3. Antagonismo de Cáncer por Par-4

Consistente con su papel en la apoptosis; Par-4 funciona como un supresor de tumor y se encuentra bajamente expresado en una gran variedad de cáncer como carcinoma renal, neuroblastoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica (Barkett and Gilmore, 1999) tumores pancreáticos, carcinomas nasofaríngeos, cáncer de endometrio, renales y pulmón. (Ahmed *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007, Moreno *et al.*, 2007, Cook *et al.*, 1999; Joshi *et al.*, 2008) Se ha reportado que el RNAm de Par-4 y su proteína se encuentran bajamente expresados mediante Ras oncogénico en una variedad de tipos celulares a través de la vía MEK-ERK. Esta baja expresión es necesaria para Ras para iniciar la transformación porque la sobreexpresión ectópica de Par-4 en células transformadas por Ras impide la formación de colonias en un ensayo de agar suave (Boehrer *et al.*, 2001). Este efecto anti-transformante puede ser atribuido al hecho de que Par-4 juega un rol en la regresión tumoral, por lo tanto, Par-4 es un antagonista de la formación y el mantenimiento del tumor (Qui *et al.*, 1999). Además en de este mecanismo de silenciamiento génico se han identificado otros; como una mutación que introduce un codón de término en el exón 3 (Arg (CGA) 189 (TGA) stop) del gen Par-4, la metilación del promotor en tumores endometriales, (Moreno *et al.*,

2007) mecanismos independientes de metilación en carcinomas renales (Cook *et al.*,1999) o modificaciones postraduccionales como inactivación de la proteína vía la fosforilación Akt1 en cáncer de próstata (Goswami *et al.*, 2005) y nasofaríngeo (Lee *et al.*, 2007). Los estudios en próstata indican que Akt1 se une a Par-4 vía su dominio ZL y fosforila a Par-4, permitiendo con esto que sea sustrato de la chaperona 14-3-3. La interacción con 14-3-3 causa un secuestro de Par-4 en el citoplasma, aislando a Par-4 de sus blancos en el núcleo y evitando con esto su potencial apoptótico en estas células. (Goswami *et al.*, 2005)

También puede controlar metástasis al inhibir la migración de las células de melanoma B16F10 actuando como regulador negativo de la actividad de la cinasa PKC. (Hanahan and Weinberg, 2002)

Por último, en los estudios de ratones Knock out de Par-4 se encontró una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores espontáneos en hígado, pulmón y endometrio además de neoplasias intraepiteliales prostáticas y un incremento en la incidencia de tumores inducibles por hormonas o químicos en la vejiga y endometrio. (Garcia-Cao *et al.*, 2005) Colectivamente estos datos validan a Par-4 en la intervención terapéutica del cáncer. (Ranganathan and Rangnekar, 2005)

5.4.4. Regulación de la Función de Par-4

Es esencial para la célula regular la actividad de Par-4 y mantenerla en un estado latente y activarlo solo cuando sea necesario. Uno de estos mecanismos de regulación es la compartimentalización; es decir Par-4 es translocado al núcleo antes de que la célula sufra apoptosis, por lo tanto la inhibición de la entrada al núcleo evita el potencial apoptótico de Par-4. Como se menciono previamente, esta proteína contiene 2 sitios NLS en el extremo N-ter, una mutante que carece de ambos NLS fue incapaz de producir apoptosis y de entrar al núcleo, NLS1 no fue necesario para la entrada nuclear y NLS2 es importante en la entrada nuclear. Consistente con estos resultados, en células cancerígenas de próstata dependientes de andrógenos (donde Par-4 no es capaz de inducir apoptosis) Par-4 es predominantemente localizado en el citoplasma. En contraste, la localización nuclear es la norma en los cánceres de células independientes de andrógenos, así como también en otras células, en donde Par-4 tiene un efecto letal. El papel funcional de NES en el extremo C-ter aun no es elucidado. (Ranganathan and Rangnekar, 2005)

Además hay datos que indican la presencia de Par-4 en los cuerpos PML (cuerpos de leucemia promielocítica) del núcleo. Aunque la relevancia de esto no es aun clara, es posible que el mecanismo apoptótico resida específicamente en los cuerpos PML. (Gurumurthy and Rangnekar, 2004) El control de la actividad de Par-4 no puede ser explicado solamente por su localización, hay mecanismos adicionales mediante los cuales su actividad es monitoreada.

Par-4 citoplasmática es compañera de varias proteínas y muchas de sus funciones pueden ser atribuidas a estas interacciones. Una de las más importantes y mas

extensivamente estudiadas es la cinasa PKC ζ . (Diaz-Meco *et al.*, 1996) Par-4 se une a PKC ζ e inhibe sus principales funciones, entre ellas la activación de NF- κ B. Además otra proteína forma parte del complejo Par-4/ PKC ζ . Cuando p62 interactúa con este complejo, el efecto de Par-4 en la inhibición de PKC ζ se pierde y como resultado se tiene la supervivencia celular. (Chang *et al.*, 2002) Otro compañero importante es la proteína del tumor de Wilms WT-1, un factor de transcripción que posee dedos de zinc y que puede actuar como inductor o represor de una gran cantidad de genes. Esta proteína es expresada durante el desarrollo de riñón, testículos, ovario y desempeña un papel importante en el desarrollo del tumor de Wilms. WT-1 induce la transcripción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, esta actividad transcripcional es inhibida cuando Par-4 está unido a WT-1, así se unen al promotor Bcl-2, inhibiendo su transcripción y promoviendo la apoptosis (Qiu *et al.*, 1999).

Par-4 también se une a la cinasa ZIPK en los cuerpos PML, esta interacción es necesaria para la inducción de la apoptosis vía ZIPK (Page *et al.*, 1999) porque Par-4 promueve las interacciones entre ZIPK y DAXX, quien es un regulador de la apoptosis.

Además Par-4 se acompleja con THAP-1, una proteína proapoptótica que está asociada con los cuerpos subnucleares PML. (Roussigne *et al.*, 2003) estas interacciones de Par-4 con ZIPK, DAXX y THAP-1 funcionan para catalizar la apoptosis, y es probable sean mediadas por el ZL de Par-4, esencial en la función proapoptótica de esta proteína. (Sells *et al.*, 1994)

5.4.5. Apoptosis Selectiva de Células Cancerosas

Como se menciona antes, Par-4 causa la apoptosis selectiva de células cancerosas, mas no de células normales o inmortalizadas, esta función selectiva no requiere del dominio de ZL presente en el extremo C-ter (El-Guendy et al., 2003), de hecho la función proapoptótica de Par-4 está localizada en el dominio central llamado SAC (Selective Apoptosis of Cancer Cells). Esta región consta de los aa 137 al 195 y es la mutante obtenida cuya secuencia fue la mínima esencial requerida para realizar la función apoptótica. Esta mutante de Par-4 es constitutivamente nuclear en células normales y cancerígenas, pero solo causa apoptosis en las células cancerígenas cuando es sobreexpresada. (Barradas *et al.*, 1999). Esto permitió suponer que además de la entrada al núcleo un evento de activación presente solo en células cancerosas es necesario para que Par-4 tenga todo su potencial apoptótico. Se creó que la fosforilación de Par-4 por PKA en el residuo T155 es necesaria para su activación ya que ambos eventos están presentes y activos en células que muestran sensibilidad a Par-4. (Gurumurthy and Rangnekar, 2004) Para la actividad apoptótica mediada por SAC no son necesarias p53 ni PTEN, y esta acción apoptótica no es inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2 ni Bcl-xL (El-Guendy *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2001).

Además en contraste a Par-4, el dominio SAC carente del ZL, no se une a Akt1 ni es fosforilado por ella. Consecuentemente el dominio SAC representa, la unidad mínima funcional necesaria para la inducción selectiva de apoptosis de las células tumorales, pero no en células normales, y es un candidato ideal para la terapia molecular. Más aun, los ratones clonados que expresan constitutivamente el dominio SAC mostraron tener un desarrollo y una duración de vida normal así como una

resistencia al desarrollo de tumores espontáneos, inducidos por oncogenes y al crecimiento de tumores autóctonos. (Zhao *et al.*, 2007)

5.4.6. Quimioprevención para la inducción de Par-4

La quimioprevención del cáncer es definida como el uso de agentes naturales, sintéticos o biológicos usados para suprimir, revertir o prevenir el proceso de carcinogénesis que convierte un cáncer en un fenotipo agresivo. La proteína Par-4 es una proteína única que induce apoptosis selectivamente de las células cancerosas. (Azmi *et al.*, 2008) El uso de agentes que logren inducir la expresión de Par-4 para promover la apoptosis por si misma o incrementar la susceptibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos podría ser de gran utilidad en la práctica clínica. En este respecto se encontró que Par-4 era sobreexpresado cuando se le administraba a pacientes concentraciones suprafarmacológicas de NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs); que son inhibidores de COX como sulindac e inhibidores de COX-2 como NS-398, SC-58125 y nimesulida.

Siendo que hay una relación entre β -catenina y COX-2 promoviendo la señalización de la supervivencia celular, la capacidad de los inhibidores de COX-2 para inducir la apoptosis necesita más atención, específicamente si Par-4 es inducido directamente como consecuencia de la inhibición de COX-2, sugiriendo con esto que β -catenina y COX-2 inhiben la expresión endógena de Par-4, o si la inducción es generada

de la acción de los inhibidores de COX-2 en otras vías de supervivencia. (Zhang and DuBois, 2000)

También se encontró que se sobreexpresaba en líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29 en respuesta a la apoptosis inducida por el agente polietilenglicol (PEG). Datos de modelos experimentales de cáncer de colon sugieren que PEG puede ser un muy buen agente quimiopreventivo por encima de los NSAIDs. (Corper *et al.*, 2000) PEG indujo unas 17 veces más la expresión de Par-4, sugiriendo un mecanismo potencial de PEG de apoptosis y quimiopreención. (Roy *et al.*, 2001)

Por último la molécula B-DIM (3,3' diindolylmethane) ha mostrado reducir la viabilidad e inhibir el crecimiento celular mediante la inducción de la apoptosis y el incremento en la sensibilidad a las drogas al inducir la expresión de Par-4 en líneas celulares de cáncer pancreático (L3.6pl y Colo-357) expuestas a Gemcitabina convirtiéndolo en unos de los agentes quimiopreventivos más recientemente probados que logran inducir la expresión de Par-4. (Azmi *et al.*, 2008)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Grupo de Estudio

Nuestro material de estudio consiste de 71 muestras de tejido embebido en parafina correspondientes a tejido tumoral y de autopsias obtenidas del archivo del Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad UMAE No.25 IMSS y muestras de tejido benigno provenientes del Departamento de Anatomía Patológica del UMAE No.23, IMSS. En todos los casos incluidos en el estudio se realizó mastectomía o biopsia por indicación médica, con previo consentimiento informado del paciente o familiar. La clasificación histológica de las neoplasias de mama fue realizada de acuerdo al criterio de la Organización Mundial de la Salud. Los grupos incluyen carcinomas invasivos lobulillares, carcinomas invasivos ductales, carcinomas pleomórficos, sarcomatoides, lesiones benignas de mama conformadas por papilomas intraductales, mastopatías fibroquísticas, edematosas esclerosantes y fibroadenoma y muestras de mujeres que no mostraron anomalías

histológicas en la mama. Todas las muestras de pacientes de lesiones benignas y de mama normal provenían de pacientes sin cáncer. Los casos fueron seleccionados a partir de la base de datos de pacientes atendidas durante el periodo 2002-2008. No hubo cambios importantes en los procedimientos de laboratorio durante este periodo. No se apreciaron diferencias significativas en la intensidad en los casos diagnosticados mas tempranamente comparado con los últimos. Las secciones provenientes de las muestras de tejido de mama fijadas en formaldehído y embebidas en parafina fueron teñidas con hematoxilina eosina y revisadas independientemente por dos patólogos para establecer el diagnostico.

6.2. Criterios de Inclusión

Se incluyeron pacientes femeninas con expediente clínico actualizado ya sea en forma física o electrónica, que contenían los datos personales no patológicos y patológicos de importancia para enfermedades de mama, fecha de diagnóstico, etapa clínica y diagnóstico histopatológico. No había límite de edad, para el grupo de pacientes con carcinoma mamario, se incluyeron aquellas que tuvieran diagnóstico histopatológico establecido según el sistema TNM, (ACS, 2007-2008) así como tejido preservado en parafina, cuyas condiciones fueron comprobadas por el especialista en patología. En el grupo de pacientes con patología benignas de mama, se incluyeron aquellas que tenían diagnóstico histopatológico establecido de acuerdo a los criterios de

Dupont como Lesiones no proliferativas o Lesiones proliferativas sin atipia. (Dupont and Page, 1985) Para el grupo de pacientes con tejido normal de mama, se incluyeron tejidos del banco de bloques del departamento de anatomía patológica, que reunieron características histológicas de tejido sano, proveniente de biopsias preservadas en parafina que se emplean para emitir diagnóstico de causa de muerte. Por último se seleccionaron laminillas que presentaron una adecuada cantidad de tejido para su análisis: mínimo 100 núcleos por muestra.

6.3. Criterios de Exclusión

Se descartaron los casos en los que el diagnóstico histopatológico reportado en el expediente no concuerde con la revisión de tejido. Así como también los especímenes que presenten reacción estromal marcada (desmoplasia) y/o necrosis tumoral. También fueron descartados especímenes con pérdida del tejido durante el procedimiento, muestras cuyos controles mostraron los resultados inesperados tales como la presencia de un fondo que dificultara la resolución de la tinción o muestras cuya zona teñida no haya sido el área a evaluar.

6.4. Inmunohistoquímica

Para cada procedimiento, el orden de las muestras fue escogido al azar de cada uno de los grupos. Se realizó un método estándar de Inmunohistoquímica. Se cortaron secciones de 4µm de muestras de tejido de seno fijadas en formaldehído embebidas en parafina y se colocaron en laminillas silanizadas (S3002, Dako). Después se comenzó con el proceso de la inmunohistoquímica para lo cual se sumergieron en Xilol para desparafinizarlas, posteriormente se hidrataron gradualmente en una serie de etanoles y después se lavaron con agua destilada. La recuperación de Antígeno fue lograda mediante calor por 20 min a 96°C en la solución recuperadora (TRS S1699, Dako). Posteriormente las laminillas fueron enfriadas por 20 min a temperatura ambiente y lavadas de nuevo con agua destilada por 5 min para luego ser lavadas en Buffer de Lavado (TBS S1968, Dako) por 5 min. Se bloqueó la peroxidasa endógena añadiendo el reactivo correspondiente (Peroxidase blocking reagent S2001, Dako) por 15min, seguida del bloqueo de los sitios de unión no específicos con la solución correspondiente (X0909, Dako). Las secciones de tejido fueron incubadas toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario anti-Par-4 (Par4 A-10 anticuerpo monoclonal de ratón sc-1666 Santa Cruz Biotechnology a una dilución de 1:100 en diluyente de anticuerpo S3022, Dako). Como control negativo, los anticuerpos primarios fueron reemplazados con 1% de albúmina de suero fetal bovino en PBS para descartar el efecto de la peroxidasa endógena, o una inmunoglobulina no específica para probar la especificidad. La especificidad del anticuerpo fue confirmada también por Western Blot. El anticuerpo secundario utilizado fue el universal biotilado (K0690, Dako) y se

incubo por 15 min, después de un nuevo lavado de 5 min las laminillas se dejaron incubando con el complejo estreptavidina-HRP (K0690, Dako). La reactividad intracelular específica fue detectada mediante incubación con el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa de rábano por 30 min a temperatura ambiente. Después de otro lavado el anticuerpo unido fue detectado usando diaminobencidina tetrahidroclorido (DAB) como cromógeno (K3468, Dako). Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratados una serie de etanoles, aclarados en tres etapas de xilol y montados con resina (Entellan HX787224, Merck). Fueron incluidos controles positivos y negativos apropiados en cada corrida de inmunohistoquímicas. No se mostraron variaciones significativas entre las diferentes corridas comprobado mediante la repetición del 10% de los lotes.

6.5. Interpretación Inmunohistoquímica

Para la lectura inmunohistoquímica se siguieron los criterios de evaluación (Larghi, 1975) semicuantitativa de acuerdo a la tinción: Los valores se asignaron en cruces: 0 + (ausencia de coloración específica, [CE]), 1 + (1-25 \approx % células/campo con CE y tinción débil o dudosa), 2 + (25-50 \approx % células/campo con CE y tinción moderada), 3 + (50-75 \approx % células/campo con CE y tinción intensa), 4 + (más del 75 \approx % células/campo con CE y tinción muy intensa). Se considero positivo a partir de (++) en células que tengan expresión en el núcleo y/o citoplasma. Las observaciones se realizaron a doble ciego.

Para la medición cuantitativa se usó un microscopio invertido (IX70-Olympus, Tokio Japan), en el cual se capturaron las imágenes de 640x480 pixeles con el programa *Corel-Ulead VideoStudio* (version 11.0) mediante la cámara a color de alta definición (*Sony 3CCD Colour Video Camera*, Tokio Japan) integrada al microscopio. Posteriormente se analizo empleando el procesador de imagen (*ImageJ-1.41o*, Image Processing and Analysis in Java, del National Institutes of Health, Java 1.5.0_15 in the public domain) mediante el uso del análisis de partículas para determinar el valor de intensidad con un umbral (*threshold*) de 70-100, todas las imágenes fueron medidas con ese rango incluyendo únicamente los núcleos que correspondían al tamaño de 100-500 pixeles² para eliminar núcleos traslapados y artefactos.

6.6 Análisis Estadísticos

Los resultados de la inmunohistoquímica fueron obtenidos mediante dos mediciones: la cuantitativa al medir la intensidad en el programa de imagen y la semicuantitativa utilizando las cruces asignadas de acuerdo al criterio de tinción, se transformaron mediante un arcoseno ($p = \sqrt{\arccos p}$) a valores numéricos. A ambas mediciones se les aplicó una prueba de Levene y se comprobó homogeneidad en varianzas ($p > 0.05$). Finalmente se aplicó un análisis de varianza (ANOVA-una vía), para cada criterio de medición entre los grupos estudiados.

7. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 71 casos de tejido de glándula mamaria, de los cuales 12 fueron de tejido sano (Grupo I), con una media de edad de 18 años y su descripción se muestra en la tabla 1; 18 casos fueron incluidos con lesiones benignas (Grupo II), cuya media de edad fue de 32 años, donde la mayoría (72.2%) presentaron diagnóstico histopatológico de fibroadenoma, su descripción se muestra en la tabla 2; 25 casos fueron incluidos con cáncer de mama cuya supervivencia fue > 5 años (Grupo III) y su media de edad fue de 52 años, siendo el 76% de los casos con diagnóstico histopatológico de tipo ductal, su descripción se muestra en la tabla 3; finalmente el grupo de cáncer de mama cuya supervivencia fue < 5 años (Grupo IV) se compuso de 16, presento una media de edad de 54 años y el 50% de los casos fue de diagnóstico histopatológico tipo ductal, su descripción se muestra en la tabla 4.

La determinación de Par-4 mediante inmunohistoquímica mostro que su expresión fue confinada en su mayoría a células epiteliales y su localización fue

predominantemente nuclear en ambos tipos celulares siendo las células ductales las que mostraron mayor intensidad de expresión en comparación con las células mioepiteliales, con tinción de estroma no apreciable. Se mostro heterogeneidad de la tinción, mostrando variaciones en la intensidad entre las muestras analizadas. En la figura 1 se incluye un ejemplo de una imagen representativa de cada grupo de estudio. Se vio una expresión intensa en el núcleo de las células neoplásicas de los carcinomas invasivos y las lesiones benignas de la mama (A, C y B respectivamente). Es de mencionar que los tejidos sanos en las laminillas que también contenían tumor mostraron un distribución de la expresión y patrón similar a su contraparte neoplásica (dato no mostrado). Mientras que en las muestras de tejido normal de mama se mostro una tinción débil o nula (D).

Los valores de dicha expresión, se muestran en la última columna de cada una de las tablas correspondientes a los grupos estudiados. Se determino que existe homogeneidad de varianzas en las mediciones semicuantitativas y cuantitativas ($P > 0.05$).

El ANOVA en la medición semicuantitativa reveló que el Grupo I fue diferente a los otros grupos ($P < 0.05$). Y con el análisis de la medición cuantitativa, se pudo corroborar que no solamente el Grupo I es diferente a los otros grupos, sino que también lo fue el Grupo IV ($P < 0.05$), mientras que el Grupo II y el Grupo III, son iguales.

En la grafica 1, se muestran los valores cuantitativos de la intensidad medida a partir de la expresión inmunohistoquímica de Par-4, resultando la menor expresión en el Grupo I ($x=72.45$) y en el Grupo IV ($x=86.31$), mientras que la mayor expresión se registro en el Grupo II ($x=97.68$) y Grupo III ($x=101.96$).

Tabla 1. Descripción de casos con tejido histológicamente normal (Grupo I).

No	Edad	AHF*	APP**	Inmunohistoquímica para	
				Par-4	
				Semicuantitativa	Cuantitativa
1	12	(-)	(-)	+++	63.25
2	12	(-)	(-)	+++	60.72
3	12	(-)	(-)	+++	63.25
4	14	(-)	(-)	++	70.43
5	15	(-)	(-)	+	75.78
6	15	(-)	(-)	+	71.23
7	17	(-)	(-)	0	72.01
8	22	(-)	(-)	+	77.97
9	23	(-)	(-)	0	77.55
10	23	(-)	(-)	0	69.80
11	25	(-)	(-)	+	89.63
12	25	(-)	(-)	+	77.86

* Antecedentes Heredo-Familiares de cáncer de mama. ** Antecedentes Personales Patológicos de importancia para cáncer de mama.

Tabla 2. Descripción de casos con tejido mamario de lesiones benignas (Grupo II).						
No	Edad	AHF*	APP**	Dx. Histopatológico	Inmunohistoquímica para PAR-4	
					Semicuantitativa	Cuantitativa
1	13	(-)	(-)	Fibroadenoma	+++	91.75
2	15	(-)	(-)	Fibroadenoma	++++	98.67
3	21	(-)	(-)	Fibroadenoma	+++	99.11
4	23	(-)	(-)	Mastopatía Fibroquística	++	95.35
5	25	(-)	(-)	Fibroadenoma	++++	94.80
6	26	(-)	(-)	Fibroadenoma	++++	100.24
7	26	(+)	(-)	Fibroadenoma	++++	95.68
8	27	(-)	(-)	Adenosis Esclerosante	+++	101.57
9	29	(-)	(-)	Fibroadenoma	+++	100.31
10	29	(-)	(-)	Fibroadenoma	+	109.85
11	36	(+)	(-)	Fibroadenoma	++++	93.65
12	38	(+)	(-)	Fibroadenoma	++++	102.01
13	38	(-)	(+)	Mastopatía Fibroquística	+++	102.92
14	42	(-)	(+)	Mastopatía Fibroquística	++++	95.40
15	45	(-)	(-)	Fibroadenoma	++++	89.07
16	48	(-)	(-)	Fibroadenoma	++++	85.65
17	52	(-)	(+)	Papiloma Intraductal	+	102.77
18	53	(-)	(-)	Fibroadenoma	+++	99.54

* Antecedentes Heredo-Familiares de cáncer de mama, ** Antecedentes Personales Patológicos de importancia para cáncer de mama.

Tabla 3. Descripción de casos con cáncer de mama y supervivencia > 5 años (Grupo III).

No	Edad	APP*	TNM**	Dx. Histopatológico	Inmunohistoquímica para PAR-4	
					Semicuantitativa	Cuantitativa
1	31	(-)	T3N1M0	Ductal	++++	93.46
2	35	(-)	T4N2M0	Ductal	+++	106.96
3	37	(-)	T4N1M0	Ductal	+++	107.67
4	41	(-)	T4N2M0	Ductal	+++	132.49
5	41	(-)	T4N2M0	Ductal	+++	104.75
6	43	(-)	T4N1M0	Túbulo-lobulillar	+++	111.30
7	44	(+)	TXN1M0	Ductal	+++	89.87
8	45	(+)	T2N1M0	Ductal	++++	91.09
9	47	(+)	T3N1M0	Pleomorfico	++++	114.83
10	49	(-)	T4N1M0	Ductal	+++	97.08
11	49	(-)	T3N1MX	Ductal	+++	100.76
12	51	(-)	T3N1M0	Pleomorfico	++++	104.16
13	53	(+)	T4N2M0	Ductal	+++	110.33
14	53	(-)	-	Lobulillar	++++	93.64
15	54	(-)	T3N1M0	Túbulo-lobulillar	+++	104.14
16	55	(-)	T4N2MX	Ductal	++++	118.43
17	56	(-)	T3N1MX	Ductal	+++	95.69
18	58	(-)	T4N1M0	Ductal	+++	102.40
19	59	(-)	T3N0M0	Ductal	+++	95.97
20	60	(-)	T4N2MX	Ductal	+++	101.17
21	62	(-)	T4N0N0	Ductal	+++	109.39
22	66	(-)	T1N1M0	Sarcomatoide	++++	93.91
23	70	(-)	T3N2M0	Ductal	+++	96.60
24	72	(+)	T4N2M0	Ductal	+++	103.78
25	81	(-)	T4N2MX	Ductal	++++	99.89

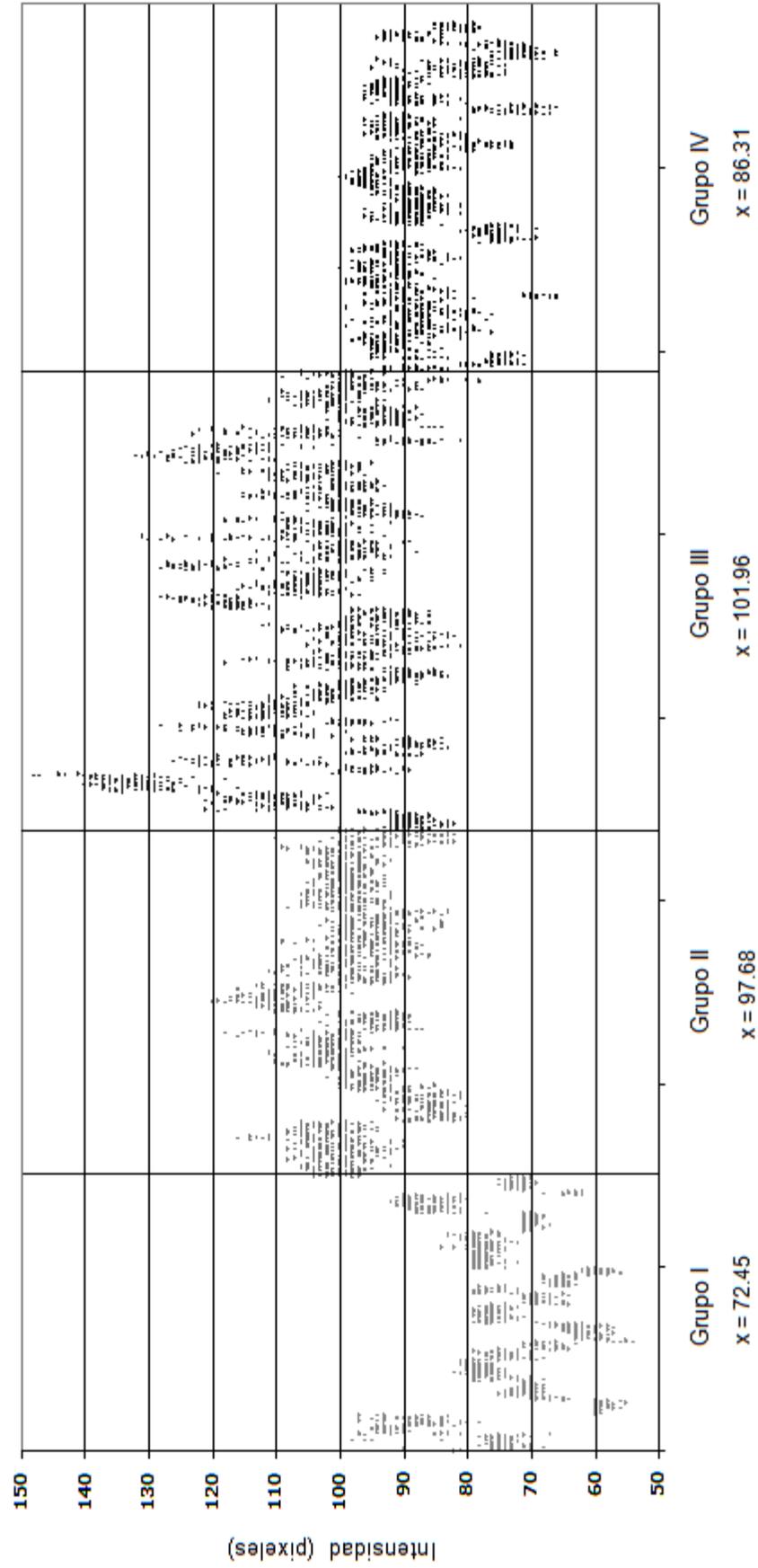
* Antecedentes Personales Patológicos de importancia para cáncer de mama. ** Clasificación internacional TNM para Ca de mama.

Tabla 4. Descripción de casos con cáncer de mama y supervivencia < 5 años (Grupo IV).

No	Edad	AHF*	Estadio Clínico	Dx. Histopatológico	Inmunohistoquímica para PAR-4	
					Semicuantitativa	Cuantitativa
1	29	0	III B	Canalicular Infiltrante	++	73.42
2	33	0	III C	Ductal	++++	81.92
3	43	1	IV	Ductal	+	94.75
4	45	0	IV	Ductal	++	91.81
5	48	0	IV	Ductal	++	86.02
6	48	2	IV	Ductal	++++	83.76
7	49	0	IV	Canalicular Infiltrante	+++	87.92
8	52	2	IV	Ductal	+++	90.80
9	56	0	IV	-	++++	88.40
10	59	0	IV	-	+++	88.99
11	59	0	IV	Canalicular Infiltrante	++	87.71
12	62	1	IV	Canalicular Infiltrante	+++	92.04
13	65	0	III C	Canalicular Infiltrante	++++	80.39
14	71	0	IV	Ductal	+++	90.49
15	74	0	IV	Ductal	++++	75.12
16	77	2	IV	Canalicular Infiltrante	+++	87.55

* Antecedentes Heredo-Familiares de importancia para cáncer de mama.

Grafica 1. Distribución de los valores cuantitativos de la inmunohistoquímica de Par-4 en tejido mamario de los cuatro grupos de estudio.



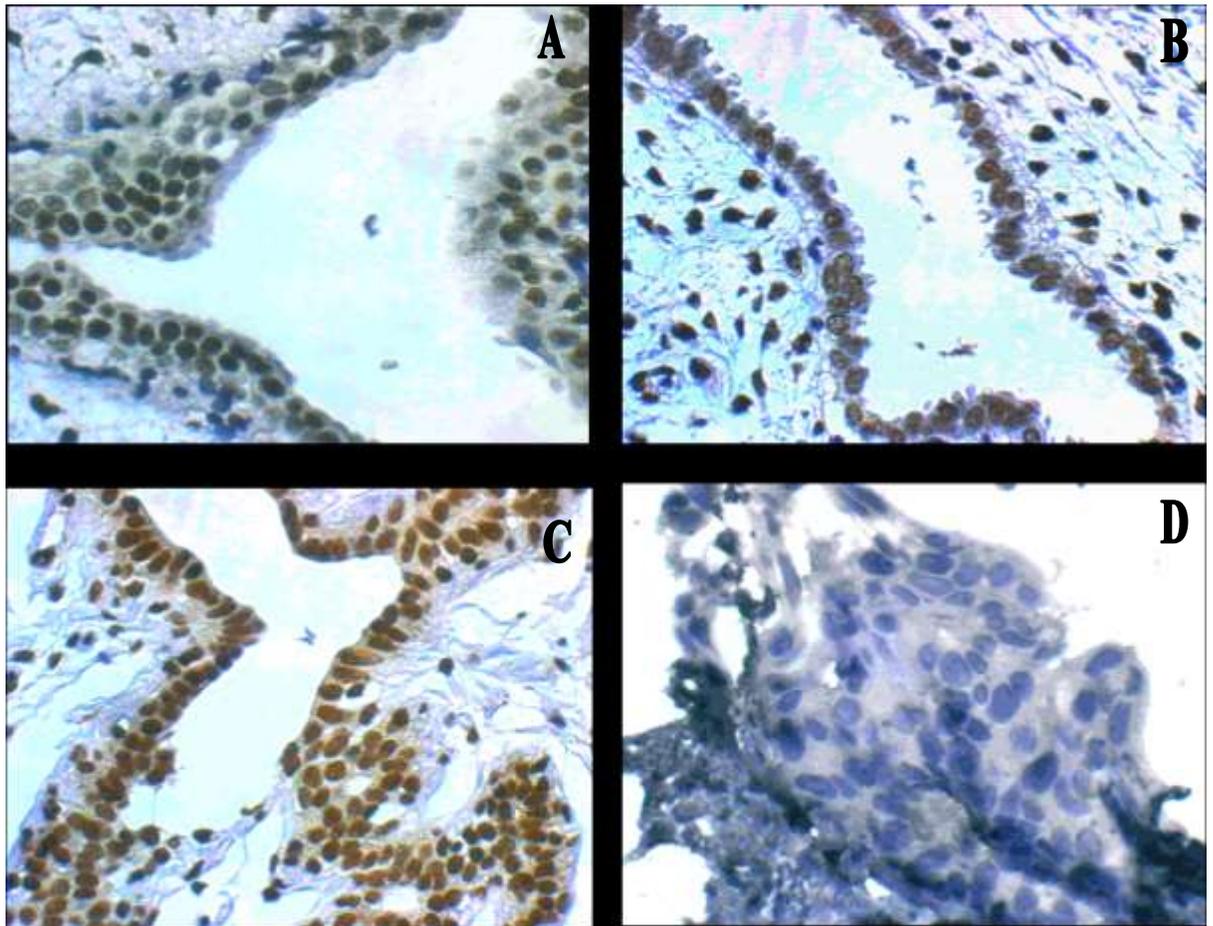


Figura 7. Inmunohistoquímica de Par-4 en tejido mamario. Tinción intensa de tejido neoplásico Grupo III (A), tejido benigno Grupo II (B) y neoplásico Grupo IV (C) de mama mostrando localización principalmente nuclear. D Tinción negativa del tejido normal de mama Grupo I.

8. DISCUSIÓN

Encontramos que la expresión de Par-4 mediante inmunohistoquímica fue confinada en su mayoría a células epiteliales siendo las células ductales las que mostraron mayor intensidad de expresión en comparación con las células mioepiteliales; en un estudio realizado en tejido de glándula mamaria de rata encontraron que Par-4 fue predominantemente expresado en las células mioepiteliales, pero las células epiteliales ductales no mostraron una expresión detectable de la proteína. Lo mismo fue observado en el tejido de próstata y mencionan que el nivel de Par-4 disminuye durante la diferenciación de estas células. Posteriormente sometieron el tejido de próstata a ablación de andrógenos y midieron nuevamente mediante inmunohistoquímica los niveles de Par-4 encontrando una inducción de la expresión de Par-4 en las células ductales de las ratas castradas desde el día 1 y que su intensidad disminuyó para el día 5 del procedimiento, estos hallazgos sugieren que la inducción de Par-4 es un evento temprano en la apoptosis de las células ductales en respuesta a la falta de estímulo hormonal. (Boghaert *et al.*, 1997) Esto nos indica que la expresión de Par-4 en las células ductales podría estar relacionada a la apoptosis de estas células, además estas son las responsables de más del 90% de los cánceres de mama humanos, (Streuli and Haslam,

1998) son hormono dependientes, es decir proliferan con el estímulo estrogénico (Vogel *et al.*, 1981) y usualmente mueren después de la ablación hormonal a diferencia de las células mioepiteliales (Walker *et al.*, 1989; Furth *et al.*, 1997) y tomando en cuenta que los cánceres de mama son tumores hormono dependientes en su mayoría, ya que expresan el receptor estrógeno en el 65% de tumores primarios y hasta en un 55% sus metástasis; (Clark and McGuire, 1999) el hallazgo de la alta expresión de Par-4 en las células luminales podría ser una ventaja a la hora de responder a un tratamiento de tipo endocrino.

Además la apoptosis mediada por Par-4 no requiere de p53 (El-Guendy *et al.*, 2003) y esto es importante ya que esta última se presenta mutada hasta en un 30% de los cáncer de mama (Elledge and Allred, 1994) y no es posible reclutar la vía apoptótica mediada por ella y en estudios en ratones aparenta no estar involucrada en la muerte dependiente de hormonas en el epitelio mamario. (Li *et al.*, 1996)

En contraste, la pérdida de la proteína anti apoptótica Bcl-2 ha demostrado ser un factor importante en la regulación de la supervivencia de las células ductales de mama (Schorr *et al.*, 1999) sobre todo en la respuesta a estímulos apoptóticos, (Shilkaitis *et al.*, 2000) además es bien conocida su capacidad para producir resistencia a múltiples drogas, retardando o previniendo la apoptosis inducida por todos los agentes quimioterapéuticos usados en la actualidad y su sobreexpresión se asocia a un mal pronóstico (Reed *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1996; Raffo *et al.*, 1995) y esto es importante ya que varios estudios indicaron una sobreexpresión de Par-4 en células que se dirigían a apoptosis y que Par-4 ejerció su efecto proapoptótico a través de la

regulación negativa de la expresión de Bcl-2, (Diaz-Meco *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 1999; Boehrer *et al.*, 2002; Bieberich *et al.*, 2001) más adelante fue más clara esta relación al demostrarse que Par-4 actúa como un represor transcripcional de Bcl-2 al unirse a su promotor a través de una interacción con WT1 logrando así modular negativamente su expresión. (Cheema *et al.*, 2003) Por lo tanto el haber encontrado niveles significativamente más altos de expresión de Par-4 en los grupos de supervivencia mayor a 5 años y de lesiones benignas podría haberles conferido una mejor respuesta a los estímulos apoptóticos en comparación con el grupo de mal pronóstico.

Esta proteína ha demostrado mecanismos pro apoptóticos adicionales a la regulación de Bcl-2, mismos que pudiesen haber influido en mejorar la supervivencia del grupo de cáncer con los mayores niveles de expresión, entre ellos su habilidad para translocar Fas y su ligando a la membrana plasmática, (Chakraborty *et al.*, 2001) a la interacción con Dlk, (Kögel *et al.*, 1998) a la inhibición de NF- κ B (Diaz-Meco *et al.*, 1999) y la consecuente disminución de los inhibidores de las caspasas (IAPs) (Baldwin, 1996; Barkett and Gilmore 1999).

Por lo tanto, el incremento en la expresión de Par-4 produce una disminución en el umbral a los estímulos de muerte celular programada (Rhangathan and Rangnekar, 2005).

Además, para que Par-4 tenga todo su potencial apoptótico necesita estar localizado en el núcleo de las células cancerosas (Gurumurthy *et al.*, 2005) y nosotros observamos una intensa expresión nuclear de la mayor parte de las células neoplásicas

de los carcinomas invasivos y de las células de las lesiones benignas de la mama y con una menor expresión en los tejidos normales.

Por último, un objetivo de este estudio fue determinar si había una asociación entre los niveles de expresión de Par-4 y el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama; el hallazgo de que hay una diferencia significativa en los niveles de expresión de Par-4 entre los grupos, además que los niveles más bajos se presentaron en el grupo de mal pronóstico podría remarcar el papel de Par-4 como supresor tumoral (Barkett and Gilmore, 1999), ya que el proceso de crecimiento y progresión tumoral se liga primariamente a la supresión de las vías de señalización que normalmente protegen contra la proliferación celular incontrolada (Stambolic *et al*, 1999; Hanahan 2000; Denmeade and Isaacs, 1996). Además ya ha sido reportada la disminución de la expresión de Par-4 en una gran variedad de cáncer (Barkett and Gilmore, 1999; Ahmed *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 1999; Joshi *et al.*, 2008) y se sabe que es necesaria su baja expresión para lograr la transformación de algunos tipos celulares (Boehrer *et al.*, 2001).

Por lo tanto la disminución en los niveles de expresión de Par-4 en la progresión tumoral del cáncer de mama podría estar ligada a la respuesta a la terapia y la sobrevivencia global. Por ello podría ser un biomarcador pronóstico valioso y en combinación con el panel de mama utilizado a la fecha podría establecer más acertadamente la sobrevivencia global a la enfermedad en un paciente en particular.

9. CONCLUSIONES

Usando inmunohistoquímica e interpretándola mediante métodos cuantitativos encontramos una expresión disminuida de Par-4 en el grupo de cáncer de mama de mal pronóstico en relación al grupo de buen pronóstico y de lesiones benignas, y una baja o nula expresión en los tejidos de pacientes sanas.

Encontramos que la expresión de Par-4 fue principalmente nuclear en el epitelio de mama y que se tiñó más intensamente en las células ductales mientras que en las células mioepiteliales fue más débil.

Nuestros resultados nos hacen suponer que el nivel de expresión de Par-4 en mama determinado mediante inmunohistoquímica podría estar involucrado en la regulación de la proliferación celular y en la supervivencia en las células hormono dependientes de mama y que su pérdida podría estar involucrada en la progresión tumoral, además de que podría ser un marcador pronostico útil de la supervivencia y respuesta a la terapia endocrina.

10. LITERATURA CITADA:

Ahmed MM, Sheldon D, Fruitwala MA, Venkatasubbarao K, Lee EY, Gupta S, Wood C, Mohiuddin M, Strodel WE. 2008. Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *Int J Cancer*. 122(1):63-70.

Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A. 1996. 17-estradiol induces cyclin D gene transcription, p36-p34 complex activation and p105 phosphorylation during mitogenic stimulation of G1 arrested human cancer cells. *Oncogene*. 12:23 15-2324.

American Cancer Society. 2007-2008. *Breast Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.

Ashbeck EL, Rosenberg RD, Stauber PM, Key CR. 2007. Benign breast biopsy diagnosis and subsequent risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16(3):467-72.

Azmi AS, Ahmad A, Banerjee S, Rangnekar VM, Mohammad RM, Sarkar FH. 2008. Chemoprevention of pancreatic cancer: characterization of Par-4 and its modulation by 3,3' diindolylmethane (DIM). *Pharm Res*. 25(9):2117-24.

Baldwin AS. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 14:649-681.

Barkett M, Gilmore TD. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18:6910-6924.

Barradas M, Monjas A, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. 1999. The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J.* 15;18(22):6362-9.

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y, 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 Research* 58: 2825-2831.

Beenken SW, Bland KI. 2002. Biomarkers for breast cancer. *Minerva Chir.* 57(4):437-48.

Bieberich E, MacKinnon S, Silva J, Noggle S, Condie BG. 2003. Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. *J Cell Biol.* 162:469-479.

Bieberich E, MacKinnon S, Silva J, Yu RK. 2001. Regulation of apoptosis during neuronal differentiation by ceramide and b-series complex gangliosides. *J Biol Chem.* Nov 30; 276 (48): 44396-404.

Bieberich E, Silva J, Wang G, Krishnamurthy K, Condie BG. 2004. Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants. *J Cell Biol.* 167:723-734.

Bigbee W, Herberman RB. 2003. Tumor markers and immunodiagnosis. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc.

Boehrer S, Chow KU, Puccetti E, Ruthardt M, Godziszard S, Krapohl A, Schneider B, Hoelzer D, Mitrou PS, Rangnekar VM, Weidmann E. 2001. Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. *Hematol. J.* 2:103-107.

Boghaert ER, Sells SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strange R, Rangnekar VM. 1997. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.* 8: 881-90.

Bonadonna G. 1999. The pathologist and the clinical oncologist: a new effective partnership in assessing tumor prognosis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 61: 585-598.

Chakraborty M, Qiu SG, Vasudeva KM, Rangnekar VM. 2001. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* 61:7255-7263.

Chang S, Kim JH, Shin J. 2002. p62 forms a ternary complex with PKCzeta and Par-4 and antagonizes Par-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Lett.* 510: 57-61.

Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, Lopez-Berestein G. 2003. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J Biol Chem.* 278 (22):19995-20005.

Clark GM, McGuire WL. 1999. New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology*; 23: 49-54.

Cook J, Krishnan S, Ananth S, et al. 1999. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* .18:1205-8.

Corpet DE, Parnaud G, Delverdier M, Peiffer G, Tache S. 2000. Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. *Cancer Res.* 60; 3160-3164.

Denmeade SR, Isaacs JT. Activation of programmed (apoptotic) cell death for the treatment of prostate cancer. *Adv Pharmacol* 1996; 35:281-306.

Diallo R, Schaefer K-L, Poremba C, Shivazi N, Willman V, Buerger H, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. 2001. Monoclonality in normal epithelium and in hyperplastic and neoplastic lesions of the breast. *J Pathol.* 193:27-32.

Diaz-Meco MT, Lallena MJ, Monjas A, Frutos S, Moscat J. 1999. Inactivation of the inhibitory κ B protein kinase/nuclear factor κ B pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor α induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:19606-19612.

Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sánchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. 1996. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell.* 86:777-786.

Domínguez MA, Marcos M., Meiriño R, Villafranca E, Dueñas MT, Arias F., Martínez E. Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano. 2001. *ANALES Sis San Navarra*; 24 (Supl. 1): 99-110.

Dowsett M. 2001. Overexpression of Her-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8,191-195.

Dupont WD, Page DL. 1985. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med.* 312:146 - 51.

Dupont WD, Page DL. 1989. Relative risk of breast cancer varies with time since diagnosis of atypical hyperplasia. *Hum Pathol.* 20:723-5.

El-Guendy N, Rangnekar VM .2003. Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp Cell Res* 283: 51-66.

El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. 2003. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cell Biol*. Aug; 23(16):5516-25.

Elledge RM, Allred DC. 1994. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 32:39-47.

Ernester VL. 1981. The Epidemiology of benign breast disease. *Epidemiologic Reviews* 3:184-202.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Lyon: IARC Press.

Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RVP. 1998. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*.122:1053-5.

Furth PA, Bar-Peled U, Li M. 1997. Apoptosis and mammary gland involution; reviewing the process. *Apoptosis* 2: 19-24.

Garcia-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Caballero JM, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M. 2005. Tumour suppression activity of the proapoptotic regulator Par-4. *EMBO Rep* 2005;6:577-83.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ & Panel Members. 2005. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology* 16:1569-1583.

Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM. 2005. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol. Cell* 20, 33-44.

Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. 2005. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol Cell Biol* 25:1146-61.

Gurumurthy S, Rangnekar VM. 2004. Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem*. 91:504-512.

Hanahan D, Weinberg RA. 2002. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH. 2005. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 353:229-37.

Hortobagyi, G.N. 1998. Drug Therapy: Treatment of Breast Cancer. *The new England Journal of Medicine*, 339 (14), 974-984.

Huan Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, Bhalla K. 1997. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21bax ratio and inhibits Taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. And Treatment* .42:73-81.

Hulka BS, Moorman PG.2001. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 38(1):103-113.

Hurtado Estrada Gabino, Sánchez Forgach Ernesto, Miranda Hernández Hernando, Mares Corona José, Medina Villaseñor Efraín, Grifaldo Maldonado Bruno, González Parra Juan. 2004. Factores de pronóstico en cáncer de mama. *Gamo*; 3(2) ,28-32.

Hutter RP. 1986. Consensus meeting: is "fibrocystic disease" of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med*.110:171-3.

Johnstone RW, Tommerup N, Hansen C, Vissing H, Shi Y. 1998. Mapping of the human PAWR (par-4) gene to chromosome 12q21. *Genomics*.53:241-3.

Joshi J, Fernandez-Marcos PJ, Galvez A, Amanchy R, Linares JF, Duran A, Pathrose P, Leitges M, Cañamero M, Collado M, Salas C, Serrano M, Moscat J, Diaz-Meco MT.2008. Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis. *EMBO J*. 27(16):2181-93.

Kass L, Erler JT, Dembo M, Weaver VM. 2007. Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(11):1987-94.

Kögel D, Plöttner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH. 1998. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones.*Oncogene*. Nov 19;17(20):2645-54.

Krieger N, Hiatt RA. 1992. Risk of breast cancer after benign breast diseases. Variation by histologic type, degree of atypia, age at biopsy, and length of follow-up. *Am J Epidemiol*. 135:619-31.

Lee JW, Lee KF, Hsu HY, Hsu LP, Shih WL, Chu YC, Hsiao WT, Liu PF. 2007. Protein expression and intracellular localization of prostate apoptosis response-4 (Par-4) are associated with apoptosis induction in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 257(2):252-62.

Lewis MT. 2000. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Research*. 2: 158-169.

Li M, Hu J, Heermeier K, Henninghausen L, Furth PA. 1996. Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceed through p53-independent pathways. *Cell Growth Differ.* 7: 13-20.

Liang K, Lu Y, Jin W, Ang K, Milas L, Fan Z, Hudziak R, Lewis G, Winget M, Fendly B, Shepard M, Ullrich A. 1989. P185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1165-1172.

London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. 1992. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA.*267:941-4.

Mattson MP, Duan W, Chan SL, Camandola S. 1999. Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J Mol Neurosci.*13:17-30.

Moll R, Franke WW, Schiller DL. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31:11-24.

Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I, Hardisson D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M, Palacios J. 2007. Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. *Cancer Res.* 67(5):1927-34.

Murphy MJ. 1998. Molecular Action and Clinical Relevance of Aromatase Inhibitors. *The oncologist.* 3:129-130.

Nagle RB, Bocker W, Davis JR, Heid HW, Kaufmann M, Lucas DO, Jarasch ED. 1986. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 34:869-881.

Osborne C, Schiff R. 2005. Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Oncology* 23: 1616-1622.

Page G, Kögel D, Rangnekar V, Scheidtmann KH. 1999. Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene.* 18(51):7265-73.

Pietras R, Fendly B, Chazin V, Pegram M, Howell S, Slamon D. 1994 Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 9: 1829-1838.

Qiu G, Ahmed M, Sells SF, Mohiuddin M, Weinstein MH, Rangnekar VM. 1999. Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogene* 18: 623-31.

Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. 1995. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 55: 4438-4445.

Ranganathan P, Rangnekar VM. 2005. Regulation of cancer cell survival by Par-4. *Ann NY Acad Sci.* 1059:76-85.

Reed JC, Kitada S, Takayama S, Miyashita T. 1994. Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann. Oncol.* 5 (Suppl. 1): 61-65.

Renwick SB. 1976. The possible relationship between mammary dysplasia and breast cancer. *Aust N Z J Surg.* 46 (4):341-3.

Resse DM, Amad D, Slamon DJ. 1997. Her-2/neu Signal Transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem cells.* 15:1-8.

Rodríguez-Cuevas SA, Labastida SA, Tapi R, Kuri P, Macias C. 1999. Registro histopatológico de neoplasias en México. Población derechohabiente del IMSS 1991-1996. México: Ciencia y Cultura Latinoamericana, p: 56.

Ross, J.S, J. Stec, E. Clark, M. Ayers, N. Leschly. WF. Symmons, G.N. Hortebogy & L. Pusztai. 2003. Breast Cancer Biomarkers and Molecular Medicine. Part 1. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3 (5): 573-85).

Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard JP. 2003. THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene.* 22(16):2432-42.

Roy HK, DiBaise JK, Black J, Karolski WJ, Ratashak A, Ansari S. 2001. Polyethylene glycol induces apoptosis in HT-29 cells: Potential mechanism for chemoprevention of colon cancer, *FEBS Lett.* 496 , 143-146.

Rubioa T, Marco Vicente. 2006. La importancia de los márgenes quirúrgicos en la cirugía conservadora en el cáncer de mama. Instituto Oncológico Teknon. Centro Médico. Unidad de Mama. *Cir Esp,* 79:3-9.

Schorr K, Li M, Bar-Peled, U, Lewis A, Heredia A, Lewis B, Knudson M, Korsmeyer SJ, Jager R, Weiher H, Furth PA. 1999. Gain of Bcl-2 is more potent than Bax in regulating mammary epithelial cell survival in vivo. *Cancer Res.* 59: 2541-2545.

Sekhri KK, Pitelka DR, DeOme KB. 1967. Studies of mouse mammary glands. Cytomorphology of the normal mammary gland. *J Natl Cancer Inst.* 39(3):459-90.

Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S, Rangnekar VM. 1994. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* 5:457-466.

Shilkaitis A, Graves J, Mehta RR, Hu L, You M, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Christov K. 2000. Bcl-2 and Bax are differentially expressed in hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis. *Cell Growth Differ.* Aug; 11(8):437-45.

Shin C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. 1981. Transforming Genes of carcinomas and Neuroblastomas Introduced into mouse fibroblast. *Nature.* 290:261-264.

Simeone A, Li Y, Broemeling L, Johnson M, Tuna M, Tari A .2004. Cyclooxygenase-2 Is Essential for HER2/neu to Suppress N-(4 Hydroxyphenyl) retinamide Apoptotic Effects in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 64: 1224-1228.

Siwak D, Mendoza E, Tari A. 2003. HER2/neu uses Akt to suppress retinoic acid response element binding activity in MDA-MB-453 breast cancer cells. *International Journal of Oncology* 23: 1739-1745.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A .1989. Studies of the Her-2/neu Proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244:707-712.

Slamon DJ, Romond EH, Perez EA. 2006. Advances in adjuvant therapy for breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*; 4(3):1, 4-9.

Smalley M, Ashworth A. 2003. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer.*3:832-844.

Spratt JS, Tobin GR. 1995. Gross Anatomy of the Breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the Breast*; 4th ed. WB Saunders Company, pp. 22-42.

Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. 2003. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev. Cell* 4, 371-382.

Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene* 1999; 18: 6094-103.

Streuli CH, Haslam SZ. 1998. Control of mammary gland development and neoplasia by stromal-epithelial interactions and extracellular matrix. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* . 3:107-108.

Swiatoniowski G, Dabrowska M, Klaniewski T, Molenda W. 2003. Erbb-2 overexpression in breast cancer. *Ginekol Pol.* 74: 332-338.

Thomas A, El Rouby S, Reed JC, Krajewski S, Silber, R, Potmesil M, Newcomb EW. 1996. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*, 12: 1055-1062.

Vogel PM, Georgiade NG, Fetter BF. 1981. The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol.* 104:23-34.

Walker NI, Bennett, RE, Kerr JFR. 1989. Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am. J. Anat.*, 185:19-32.

Wang J, Costantino JP, Tan-Chiu E, Wickerham DL, Paik S, Wolmark N. 2004. Lower category benign breast disease and the risk of invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 96:616-20.

Wellings SR. 1980. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathol Res Pract.* 166:515-535.

Williams JM, Daniel CW. 1983. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 97,274-290.

Xie J, Guo Q. 2004. Par-4 inhibits choline uptake by interacting with CHT1 and reducing its incorporation on the plasma membrane. *J Biol Chem.* 279:28266-28275.

Xie J, Guo Q. 2005. Par-4 is involved in regulation of beta-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 280:13824-13832.

Zhang Z, DuBois RN. 2000. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells, *Gastroenterology.* 118;1012-1017.

Zhao Y, Burikhanov R, Qiu S, Lele SM, Jennings CD, Bondada S, Spear B, Rangnekar VM. 2007. Cancer resistance in transgenic mice expressing the SAC module of Par-4. *Cancer Res.* 67(19):9276-85.

RESUMEN CURRICULAR

Luis Fernando Méndez López

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAR-4 EN CÁNCER DE MAMA Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO.

Campo de estudio: Epidemiología del cáncer de mama

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 16 de Julio de 1982, hijo del Sr. Luis Fernando Méndez Borges y la Sra. María Bernardina López Palomo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2007.

Experiencia Profesional: Fungí como Becario de Conacyt haciendo una estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León a cargo del Dr. Pablo Zapata Benavides de Agosto 2007 a Julio de 2009 trabajando en la Determinación de biomarcadores en Cáncer de mama (Proyecto de Tesis de Maestría). Fungí también como Becario del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social. Haciendo una estancia en el departamento de Citogenética Molecular a cargo de la Dra. Martha I. Dávila Rodríguez de Enero de 2003 a Julio de 2009 trabajando con citogenética de Leucemias Mieloides Crónicas.

Reconocimientos: Obtención del tercer lugar en el Concurso Estatal de Investigación en Salud en su versión 2008, entregado por el poder ejecutivo de Nuevo León a través de la Secretaria de Salud obtenido en el área de Neoplasias.